

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 in its capacity as elected Office

|  |  |
|--|--|
| Date of mailing (day/month/year)<br>06 February 2002 (06.02.02)            |  |
| International application No.<br>PCT/EP00/09217                            | Applicant's or agent's file reference<br>P12541 Dr.B           |
| International filing date (day/month/year)<br>20 September 2000 (20.09.00) | Priority date (day/month/year)<br>21 September 1999 (21.09.99) |
| Applicant<br>BORNKAMM, Georg, W. et al                                     |  |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

23 March 2001 (23.03.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

|   |   |
|---|---|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland<br>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | Authorized officer<br>ENGER Charlotte<br>Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |
|---|---|



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 in its capacity as elected Office

|  |  |
|--|--|
| Date of mailing (day/month/year)<br>13 June 2001 (13.06.01)                | Applicant's or agent's file reference<br>P12541 Dr.B           |
| International application No.<br>PCT/EP00/09217                            | Priority date (day/month/year)<br>21 September 1999 (21.09.99) |
| International filing date (day/month/year)<br>20 September 2000 (20.09.00) |  |
| Applicant<br>BORNKAMM, Georg, W. et al                                     |  |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

24 March 2001 (24.03.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

|   |                                       |
|---|---------------------------------------|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer<br>Charlotte ENGER |
| Facsimile No.: (41-22) 740.14.35  | Telephone No.: (41-22) 338.83.38      |





Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

7

|   |   |  |
|---|---|--|
| Applicant's or agent's file reference<br>P12541 Dr.B/La                                   | <b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) |  |
| International application No.<br>PCT/EP00/09217   | International filing date (day/month/year)<br>20 September 2000 (20.09.00)  | Priority date (day/month/year)<br>21 September 1999 (21.09.99) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC<br>G01N33/53 |   |  |
| Applicant<br>GSF-FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT UND GESUNDHEIT GMBH                         |   |  |

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 3 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☒ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

|  |   |
|--|---|
| Date of submission of the demand<br>23 March 2001 (23.03.01) | Date of completion of this report<br>23 January 2002 (23.01.2002) |
| Name and mailing address of the IPEA/EP                      | Authorized officer  |
| Facsimile No.  | Telephone No.   |



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/09217

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
 pages 1-21, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages 1-17, filed with the letter of 19 December 2001 (19.12.2001)
- ☒ the drawings:  
 pages 1/2-2/2, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the sequence listing part of the description:  
 pages 1-4, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

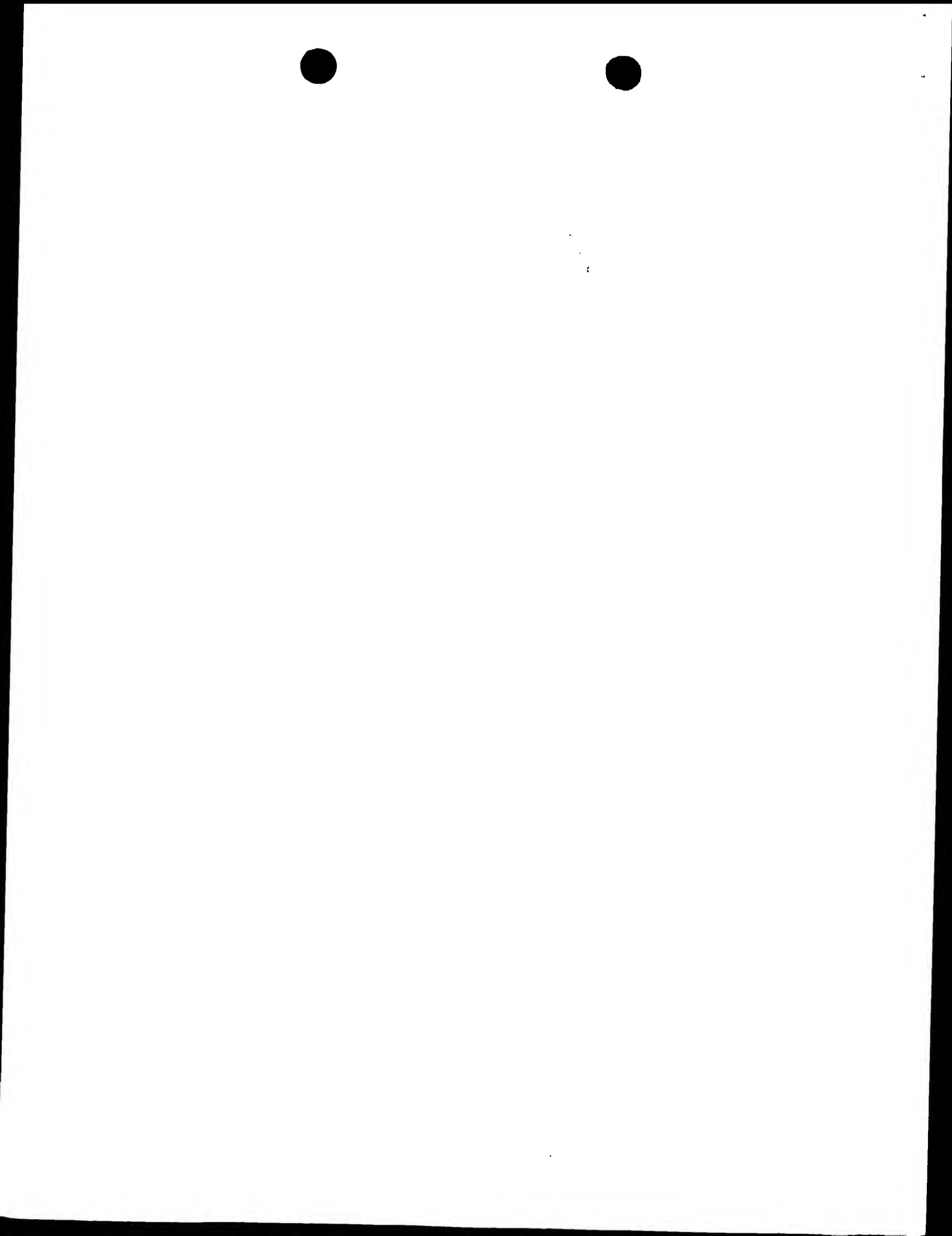
### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

|                               |        |              |     |
|-------------------------------|--------|--------------|-----|
| Novelty (N)                   | Claims | 6, 8, 17     | YES |
|                               | Claims | 1-5, 7, 9-16 | NO  |
| Inventive step (IS)           | Claims |              | YES |
|                               | Claims | 1-17         | NO  |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-17         | YES |
|                               | Claims |              | NO  |

## 2. Citations and explanations

1. This report makes reference to the following documents, which are cited in the search report; the same numbering will be used throughout the proceedings:

D1: Cancer Research, vol. 58, no. 16, 1998, pages  
3519-3525

D2: WO 99/41383

D3: WO 00/28016.

2. The submitted amendments do not introduce any substantive matter which goes beyond the disclosure in the international application as filed (PCT Article 19(2)).

3. The method according to the invention is disclosed in the following document, which is cited in the search report.

D1 discloses a method for identifying MHC-restricted T-cell antigens which comprises the same steps as the present application (see abstract and pages 3519 to 3523).

The subject matter according to Claim 1 relates to a method for identifying MHC-restricted T-cell antigens



which comprises steps (a) to (g).

The subject matter according to Claim 1 is therefore not novel within the meaning of PCT Article 33(2).

4. The subject matter according to dependent Claims 2 to 5, 7 and 9 to 16 does not appear to contain any additional features which, in combination with the features of Claim 1, could lead to a novel subject matter (PCT Article 33(2) and (3)). The additional features of dependent Claims 2 to 4, 7 and 9 to 16 are also disclosed in D1.
5. The subject matter according to dependent Claims 6 and 8 does not appear to contain any additional features which, in combination with the features of Claim 1, could lead to a subject matter that is novel and involves an inventive step (PCT Article 33(2) and (3)).

The subject matter according to Claim 1 consists in inserting the negative strand of RNA derived from the cDNA or DNA of the gene bank in one or more segments of the modified influenza viruses and/or as an additional segment in the modified influenza viruses. The subject matter according to Claim 8 consists in the production of the negative strand RNA by transcription of the pseudoviral gene segment with the RNA polymerase I.

Additional features of this type can be regarded as inventive when they show unexpected effects or properties in relation to the prior art. Effects or properties of this type are not shown in the application, however.





INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

/EP 00/09217

6. The same applies to Claim 17, which relates to the use of these modified influenza viruses (PCT Article 33(3)).



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/09217

## VI. Certain documents cited

### 1. Certain published documents (Rule 70.10)

Application No.  
Patent No.

Publication date  
(day/month/year)

Filing date  
(day/month/year)

Priority date (valid claim)  
(day/month/year)

WO 00/28016

### 2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure

Date of non-written disclosure  
(day/month/year)

Date of written disclosure  
referring to non-written disclosure  
(day/month/year)



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

|  |   |   |
|--|---|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts<br><b>P12541 Dr.B</b>  | <b>WEITERES<br/>VORGEHEN</b><br>siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen<br>Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit<br>zutreffend, nachstehender Punkt 5 |   |
| Internationales Aktenzeichen<br><b>PCT/EP 00/09217</b>         | Internationales Anmeldedatum<br>(Tag/Monat/Jahr)<br><b>20/09/2000</b>   | (Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)<br><b>21/09/1999</b> |
| Anmelder<br><b>GSF-FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT UND et al.</b> |   |   |

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☒ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 2

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☒ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.



Feld III

WORTLAUT DER ZUSAMMENFASSUNG (Fortsetzung von Punkt 5 auf Blatt 1)

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Identifizierung von MHC-restringierten Antigenen. Die nachfolgenden Schritte werden dabei vom erfindungsgemässen Verfahren mitumfasst:

- (a) Herstellen einer Genbank oder cDNA-Bank aus einer zu untersuchenden Zelle oder einem zu untersuchenden Mikroorganismus;
- (b) Einbringen der cDNA oder DNA der Genbank in das Genom von Retroviren oder als zusätzliche vRNA von modifizierten Influenzaviren, die eine erhöhte Transkriptions-, Replikations- und/oder Expressionsrate relativ zu dem Wildtyp aufweisen, um rekombinante Viruspartikel zu erhalten.
- (c) Infizieren von immortalisierten autologen Zellen, die MHC Klasse I- und/oder MHC Klasse II-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, mit den in Schritt (b) erhaltenen rekombinanten Viruspartikeln;
- (d) Exprimieren von durch die cDNA oder die DNA der Genbank kodierten Proteinen in den autologen Zellen und Präsentieren der von der autologen Zelle erzeugten Spaltprodukte dieser Proteine auf der Zelloberfläche in Verbindung mit MHC-Molekülen;
- (e) Co-Kultivieren von T-Zellen mit den autologen Zellen;
- (f) Stimulieren der T-Zellen durch solche autologen Zellen, die ein durch die T-Zellen erkanntes Antigen auf ihrer Zelloberfläche präsentieren;
- (g) Vereinzelung der Klone, die das Antigen exprimieren, und Identifizierung des Antigens.





A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGESTANDES  
 IPK 7 C12N15/10 G01N33/50

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 IPK 7 C12N G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE, WPI Data, PAJ

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X          | WANG RONG-FU ET AL: "Development of a retrovirus-based complementary DNA expression system for the cloning of tumor antigens."<br>CANCER RESEARCH,<br>Bd. 58, Nr. 16,<br>15. August 1998 (1998-08-15), Seiten<br>3519-3525, XP002107625<br>ISSN: 0008-5472<br>in der Anmeldung erwähnt | 1-4,6,<br>8-16     |
| Y          | das ganze Dokument   | 1-4,6,<br>8-16     |
| Y          | WO 99 41383 A (MAXYGEN INC)<br>19. August 1999 (1999-08-19)<br>Zusammenfassung<br>Seite 63 -Seite 64<br>Seite 103 -Seite 104, Zeile 20   | 1-4,6,<br>8-16     |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. April 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

26/04/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

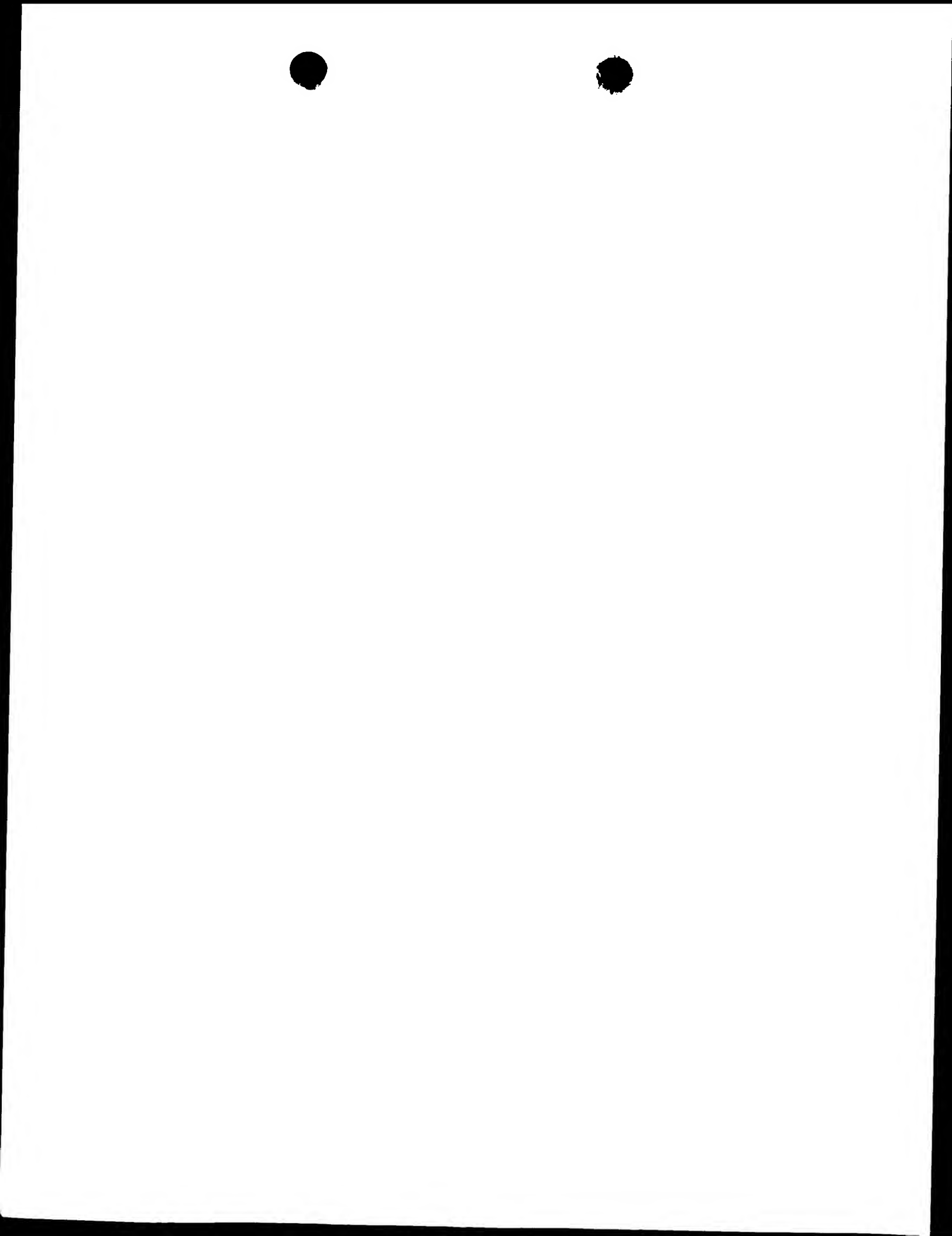
Bevollmächtigter Bediensteter

Gundlach, B



## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESCHENNE UNTERLAGEN

| Kategorie° | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| A          | WO 97 34143 A (GABATHULER REINHARD<br>;JEFFERIES WILFRED A (CA); KOLAITIS<br>GERASSIMOS)<br>18. September 1997 (1997-09-18)<br>das ganze Dokument<br>----  | 1-10,<br>13-16     |
| A          | ROSENBERG S A ET AL: "A NEW ERA FOR<br>CANCER IMMUNOTHERAPY BASED ON THE GENES<br>THAT ENCODE CANCER ANTIGENS"<br>IMMUNITY,CELL PRESS,US,<br>Bd. 10, Nr. 3, März 1999 (1999-03), Seiten<br>281-287, XP000918298<br>ISSN: 1074-7613<br>in der Anmeldung erwähnt<br>Seite 281, linke Spalte, Absatz 3<br>----- | 1-16               |
| P,X        | WO 00 28016 A (UNIV ROCHESTER)<br>18. Mai 2000 (2000-05-18)<br>das ganze Dokument<br>-----   | 1-16               |



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/09217

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9941383 A                              | 19-08-1999          | AU 2674199 A               | 30-08-1999          |
|   |                     | AU 2674299 A               | 30-08-1999          |
|   |                     | AU 3289199 A               | 30-08-1999          |
|   |                     | AU 3291099 A               | 30-08-1999          |
|   |                     | EP 1053312 A               | 22-11-2000          |
|   |                     | EP 1053343 A               | 22-11-2000          |
|   |                     | EP 1056842 A               | 06-12-2000          |
|   |                     | EP 1054973 A               | 29-11-2000          |
|   |                     | WO 9941368 A               | 19-08-1999          |
|   |                     | WO 9941369 A               | 19-08-1999          |
|   |                     | WO 9941402 A               | 19-08-1999          |
|   |                     |                            |                     |
| WO 9734143 A                              | 18-09-1997          | US 5792604 A               | 11-08-1998          |
|   |                     | AU 2088997 A               | 01-10-1997          |
|   |                     | CA 2248651 A               | 18-09-1997          |
|   |                     | EP 0888540 A               | 07-01-1999          |
|   |                     | JP 2000506973 T            | 06-06-2000          |
|   |                     | US 5845028 A               | 01-12-1998          |
| WO 0028016 A                              | 18-05-2000          | AU 1397799 A               | 29-05-2000          |
|   |                     |                            |                     |



# GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN  
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

## PCT

An:

BEHNISCH, Werner  
REINHARD, SKUHRA, WEISE  
Friedrichstr. 31  
D-80801 München Postfach 440151  
D-80750 München  
ALLEMAGNE

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG  
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN  
PRÜFUNGSBERICHTS  
(Regel 71.1 PCT)

**440151 eingegangen**  
Reinhard • Skuhra • Weise

28. Jan. 2002

Absenddatum

(Tag/Monat/Jahr)

23.01.2002

Frist

Er.

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

P12541 Dr.B/La

### WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP00/09217

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)  
20/09/2000

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)  
21/09/1999

Anmelder

GSF-FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT UND et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

#### 4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde

 Europäisches Patentamt  
D-80298 München  
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d  
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Danti, B

Tel. +49 89 2399-8161







# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

## PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES  
INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS  
ODER DER ERKLÄRUNG

(Regel 44.1 PCT)

|   |  |
|---|--|
| An<br>REINHARD, SKUHRA, WEISE<br>z.H. BEHNISCH, Werner<br>Friedrichstr. 31<br>D-80801 München Postfach 440151<br>D-80750 München<br>GERMANY | <b>Eingegangen</b><br>Reinhard • Skuhra • Weise<br><br><b>27. April 2001</b> |
|---|--|

|                                  |            |
|----------------------------------|------------|
| Absendedatum<br>(Tag/Monat/Jahr) | 26/04/2001 |
|----------------------------------|------------|

|  |   |
|--|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts<br>P12541 Dr.B | <b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Punkte 1 und 4 unten |
|--|---|

|   |  |
|---|--|
| Internationales Aktenzeichen<br>PCT/EP 00/09217 | Internationales Anmeldedatum<br>(Tag/Monat/Jahr)      20/09/2000 |
|---|--|

|   |
|---|
| Anmelder<br><br>GSF-FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT UND et al. |
|---|

1. ☒ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.  
**Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:**  
 Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):  
  
**Bis wann sind Änderungen einzureichen?**  
 Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.  
  
**Wo sind Änderungen einzureichen?**  
 Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20,  
 Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35  
 Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.
2. ☐ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2)a übermittelt wird.
3. ☐ **Hinsichtlich des Widerspruchs** gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß
 

☐ der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungssämter dem Internationalen Büro übermittelt worden sind.  
☐ noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.
4. **Weiteres Vorgehen:** Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:  
 Kurz nach Ablauf von **18 Monaten** seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90 bis bzw. 90 bis 3 vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.  
 Innerhalb von **19 Monaten** seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte.  
 Innerhalb von **20 Monaten** seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungssämtern vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswahlerklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

|   |   |
|---|---|
| Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde<br><div style="display: flex; align-items: center;"> <div>                         Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2<br/>                         NL-2280 HV Rijswijk<br/>                         Tel. (+31-70) 340-2040<br/>                         Fax: (+31-70) 340-3016                     </div> </div> | Bevollmächtigter Bediensteter<br><br>Geertruida Groeneveld-Van der Spek |
|---|---|



Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen. Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

## HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

### Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

### Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

### Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der Internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

### In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu numerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen die anderen Ansprüche nicht neu numeriert zu werden. Im Fall einer Neunummerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu numerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

### Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

#### Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19 (1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.



## ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220 (Fortsetzung)

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlautende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

- i) der Anspruch unverändert ist;
- ii) der Anspruch gestrichen worden ist;
- iii) der Anspruch neu ist;
- iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;
- v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist.

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

1. [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]:  
"Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Numerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."
2. [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]:  
"Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."
3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]:  
"Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt." Oder "Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."
4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]:  
"Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Anspruch 14 ersetzt; Anspruch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

### "Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigefügt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen.

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den internationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

### Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf internationale vorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalen Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde einreichen (siehe Regel 62.2 a), erster Satz).

### Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung der internationalen Anmeldung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmten/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordernisse jedes bestimmten/ausgewählten Amtes sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.



# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

20 JAN 2002

## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



T14

|  |  |   |
|--|--|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts<br>P12541 Dr.B/La                                    | <b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416) |   |
| Internationales Aktenzeichen<br>PCT/EP00/09217   | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)<br>20/09/2000  | Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag)<br>21/09/1999 |
| Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK<br>G01N33/53 |  |   |
| Anmelder<br>GSF-FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT UND et al.                                      |  |   |

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  
  
☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).  
  
 Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

|  |   |
|--|---|
| Datum der Einreichung des Antrags<br><br>23/03/2001  | Datum der Fertigstellung dieses Berichts<br><br>23.01.2002  |
| Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:<br><br> Europäisches Patentamt<br>D-80298 München<br>Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d<br>Fax: +49 89 2399 - 4465 | Bevollmächtigter Bediensteter<br><br>GONCALVES M L F C<br><br>Tel. Nr. +49 89 2399 8127  |





**I. Grundlage des Berichts**

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):  
**Beschreibung, Seiten:**

1-21                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-17                      eingegangen am                      21/12/2001    mit Schreiben vom    19/12/2001

**Zeichnungen, Blätter:**

1/2,2/2                      ursprüngliche Fassung

**Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:**

1-4, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen



Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,      Seiten:
- ☐ Ansprüche,      Nr.:
- ☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

1. Feststellung

|                                |                 |                   |
|--------------------------------|-----------------|-------------------|
| Neuheit (N)                    | Ja: Ansprüche   | 6,8,17            |
|                                | Nein: Ansprüche | 1-5, 7, 9-16 (no) |
| Erfinderische Tätigkeit (ET)   | Ja: Ansprüche   |                   |
|                                | Nein: Ansprüche | 1-17 (no)         |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (GA) | Ja: Ansprüche   | 1-17              |
|                                | Nein: Ansprüche |                   |

2. Unterlagen und Erklärungen  
**siehe Beiblatt**

**VI. Bestimmte angeführte Unterlagen**

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

**siehe Beiblatt**



Teil V

1. In diesem Bescheid werden folgende, im Recherchenbericht zitiert Dokumente genannt; die Numerierung wird auch im weiteren Verfahren beibehalten:

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: Cancer Research, Bd 58, Nr. 16, 1998, Seiten 3519-3525.

D2: WO 99/41383

D3: WO 00/28016

2. Die eingereichten Änderungen bringen keine Sachverhalte ein, die über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in Anmeldezeitpunkt hinausgehen (Artikel 19(2) PCT).
3. Die beanspruchte verfahren gemäß der Erfindung wird in folgend im Recherchenbericht angeführt Dokument offenbart.  
D1 offenbart ein Verfahren zur Identifizierung von MHC-restringierten T-Zelle-Antigenen mit den Selber Schritten als die vorliegenden Anmeldung (siehe Zusammenfassung und Seiten 3519 bis 3523).  
Der Gegenstand des Anspruchs 1 betrifft ein Verfahren zur Identifizierung von MHC- restringierten T-Zelle-Antigenen mit den Schritten (a) bis (g).  
Der Gegenstand des Anspruchs 1 ist somit nicht neu im Sinne von Artikel 33(2) PCT.
4. Der Gegenstand der abhängigen Ansprüche 2-5, 7 und 9-16 scheint keine zusätzliche Merkmale zu enthalten, die in Kombination mit den Merkmalen des Anspruchs 1, zu einem auf Neuheit beruhenden Gegenstand führen könnten (Art. 33(2),(3) PCT). Die zusätzliche Merkmale der abhängigen Ansprüche 2-4, 7 und 9-16 werden auch in D1 offenbart.
5. Der Gegenstand der abhängigen Ansprüche 6 und 8 scheint keine zusätzliche Merkmale zu enthalten, die in Kombination mit den Merkmalen des Anspruchs 1, zu einem auf Neuheit und erfinderischer Tätigkeit beruhenden Gegenstand führen könnten (Art. 33(2),(3) PCT).

Der Gegenstand des Anspruchs 6 besteht in der cDNA oder der DNA der



Genbank abgeleitete Negativstrang RNAs in ein oder mehrere Segmente der modifizierten Influenzaviren und/oder als zusätzliches Segmente in die modifizierte Influenzaviren einzubringen. Der Gegenstand des Anspruchs 8 besteht in die Herstellung der Negativestrang-RNA durch Transkription der pseudoviralen Gensegmente mit der RNA- Polymerase I.

Solche zusätzliche Merkmale können jedoch als erfinderische angesehen werden, wenn sie unerwartete Wirkungen oder Eigenschaften gegenüber der Stand der Technik aufweisen. Derartige Wirkungen oder Eigenschaften sind jedoch in der Anmeldung nicht Angegeben.

6. Dasselbe trifft auf der Anspruch 17 zu, die sich auf Verwendung dieser modifizierten Influenzaviren beziehet (Art. 33 (3) PCT).

Teil VI

1. WO 00/28016





PCT/EP00/09217  
GSF/Artemis

19. Dezember 2001

## **PATENTANSPRÜCHE**

1. Verfahren zur Identifizierung von MHC-restringierten Antigenen mit den nachfolgenden Schritten:

- (a) Herstellen einer Genbank oder cDNA-Bank aus einer zu untersuchenden Zelle oder einem zu untersuchenden Mikroorganismus;
- (b) Einbringen der cDNA oder DNA der Genbank als zusätzliche vRNA von modifizierten Influenzaviren, die eine erhöhte Transkriptions-, Replikations- und/oder Expressionsrate relativ zu dem Wildtyp aufweisen, um rekombinante Viruspartikel zu erhalten;
- (c) Infizieren von (immortalisierten) antigenpräsentierenden Zellen, die MHC-Klasse-I- und/oder MHC-Klasse-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, mit den in Schritt (b) erhaltenen rekombinanten Viruspartikeln;
- (d) Exprimieren von durch cDNA oder die DNA der Genbank kodierten Proteinen in den in Schritt (c) erhaltenen infizierten antigenpräsentierenden Zellen und Präsentieren der von der infizierten Zelle erzeugten Spaltprodukte dieser Proteine auf der Zelloberfläche in Verbindung mit MHC-Molekülen;
- (e) Co-Kultivieren der infizierten antigenpräsentierenden Zellen mit T-Zellen, die aus demselben Organismus stammen wie die infizierten antigenpräsentierenden Zellen, wobei T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen, die ein durch die T-Zellen erkanntes Antigen auf ihrer Zelloberfläche präsentieren, stimuliert werden;
- (f) Vereinzelung der Klone, die das Antigen exprimieren, und Identifizierung des Antigens.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die zu untersuchende Zelle eine tierische oder humane Eukaryontenzelle ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Eukaryontenzelle eine Tumorzelle oder eine durch einen Mikroorganismus infizierte Zelle ist.



4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Zelle durch ein Virus oder ein Bakterium oder einen Pilz oder eine Protozoe oder aus einer Kombination eines oder mehrerer dieser Mikroorganismen infiziert ist.

5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Genbank oder cDNA-Bank aus einem Virus, einem Bakterium, einem Pilz oder einem Protozoen hergestellt wird.

6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, wobei von der cDNA oder der DNA der Genbank abgeleitete Negativstrang RNAs in ein oder mehrere Segmente der modifizierten Influenzaviren und/oder als zusätzliches Segment in die modifizierte Influenzaviren eingebracht werden.

7. Verfahren nach Anspruch 1 oder 6, wobei die modifizierten Influenzaviren modifizierte Influenza-A-Viren sind.

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, wobei die Herstellung der Negativstrang-RNA durch Transkription der pseudoviralen Gensegmente mit der RNA-Polymerase I erfolgt.

9. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, wobei nach Schritt (b) durch Selektion eine Anreicherung der rekombinanten Viruspartikel erfolgt und/oder die rekombinanten Viruspartikel isoliert werden.

10. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, wobei nach Einbringen der cDNA oder der DNA der Genbank eine Überinfektion mit Wildtyp-Influenzavirus erfolgt.

11. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Immortalisierung der antigenpräsentierenden Zellen mit Hilfe von EBV-Genen oder Onkogenen erfolgt.

12. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, wobei als antigenpräsentierende Zellen B-Zellen oder dendritische Zellen eingesetzt werden.



13. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 12, wobei die Spaltprodukte der Proteine in Verbindung mit MHC-Klasse-I oder MHC-Klasse-II auf der B-Zelle präsentiert werden.

14. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 13, wobei die Co-Kultivierung der B-Zellen mit T-Helferzellen bei MHC-Klasse-II restringierten Antigenen und mit zytotoxischen T-Zellen bei MHC-Klasse-I restringierten Antigenen erfolgt.

15. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Stimulation der antigenspezifischen T-Zellen durch Freisetzung von Zytokinen, durch Proliferation der T-Zellen oder durch Nachweis der zytotoxischen Aktivität der T-Zellen gemessen wird.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Freisetzung der Zytokine durch ein ELISA-Verfahren nachgewiesen wird.

17. Verwendung von modifizierten Influenzaviren, die eine erhöhte Transkriptions-, Replikations- und/oder Expressionsrate relativ zu dem Wildtyp aufweisen, zur Identifizierung von MHC-restringierten Antigenen.



# PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

BEHNISCH, Werner  
Reinhard, Skuhra, Weise & Partner  
GmbH  
Postfach 44 01 51  
80750 München  
ALLEMAGNE

**Eingegangen**  
Reinhard • Skuhra • Weise  
- 2. Jan. 2001

|   |  |      |
|---|--|------|
| Date of mailing (day/month/year)<br>19 December 2000 (19.12.00)         | Frist  | Erl. |
| Applicant's or agent's file reference<br>P12541 Dr.B                    | <b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>  |      |
| International application No.<br>PCT/EP00/09217                         | International filing date (day/month/year)<br>20 September 2000 (20.09.00) |      |
| International publication date (day/month/year)<br>Not yet published    | Priority date (day/month/year)<br>21 September 1999 (21.09.99)             |      |
| Applicant<br>GSF-FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT UND GESUNDHEIT GMBH et al |  |      |

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

| <u>Priority date</u>    | <u>Priority application No.</u> | <u>Country or regional Office<br/>or PCT receiving Office</u> | <u>Date of receipt<br/>of priority document</u> |
|-------------------------|---------------------------------|---|---|
| 21 Sept 1999 (21.09.99) | 199 45 171.0                    | DE  | 08 Dece 2000 (08.12.00)                         |
| 26 Octo 1999 (26.10.99) | 199 51 543.3                    | DE  | 08 Dece 2000 (08.12.00)                         |
| 23 Dece 1999 (23.12.99) | 199 62 508.5                    | DE  | 08 Dece 2000 (08.12.00)                         |

|   |                                 |
|---|---------------------------------|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer<br>N. Wagner |
| Facsimile No. (41-22) 740.14.35   | Telephone No. (41-22) 338.83.38 |





PCY

# ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

|   |              |
|---|--------------|
| Vorname des Anmeldeamts auszufüllen   |              |
| PCT/EP 00 / 092 17  |              |
| Internationales Aktenzeichen  |              |
| (2 0. 09. 00)   | 2 0 SEP 2000 |
| Internationales Anmeldedatum  |              |
| EUROPEAN PATENT OFFICE<br>PCT INTERNATIONAL APPLICATION   |              |
| Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"  |              |
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)<br>(max. 12 Zeichen) P12541 Dr.B [La] |              |

## Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Verfahren zur Identifizierung von MHC-restringierten Antigenen

## Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und  
Gesundheit GmbH  
Ingolstädter Landstraße 1  
D-85764 Oberschleißheim  
DE

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☒ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

## Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

ARTEMIS Pharmaceuticals GmbH  
Neurather Ring 1  
D-51063 Köln  
DE

Diese Person ist:

☒ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☒ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☒ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

## Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als:

☒ Anwalt

☒ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

BEHNISCH, Werner [X]  
REINHARD, SKUHRA, WEISE [X-Partner GbR]  
Friedrichstraße 31, D-80801 München DE  
Postfach 44 01 51, D-80750 München DE

Telefonnr.:

089-38 16 100

Telefaxnr.:

089-340 14 79

Fernschreibnr.:

☐ **Zustellanschrift:** Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.



**Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER**

*Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.*

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

BORNKAMM, Georg W.  
Otilostr. 6a  
D-81243 München DE

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

HOBOM, Gerd  
Arndtstr. 14  
D-35392 Giessen DE

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

MAUTNER, Josef  
Grütznerstr. 6  
D-81667 München DE

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

NIMMERJAHN, Falk  
Dr. Pollmannstr. 6  
D-95349 Thurnau DE

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.



**Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN**

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen: wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden).

**Regionales Patent**

- ☒ **AP ARIPO-Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swasiland, TZ Vereinigte Republik Tansania, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☒ **EA Eurasisches Patent:** AM Armenien, AZ Aserbaidshan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **EP Europäisches Patent:** AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **OA OAPI-Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben).

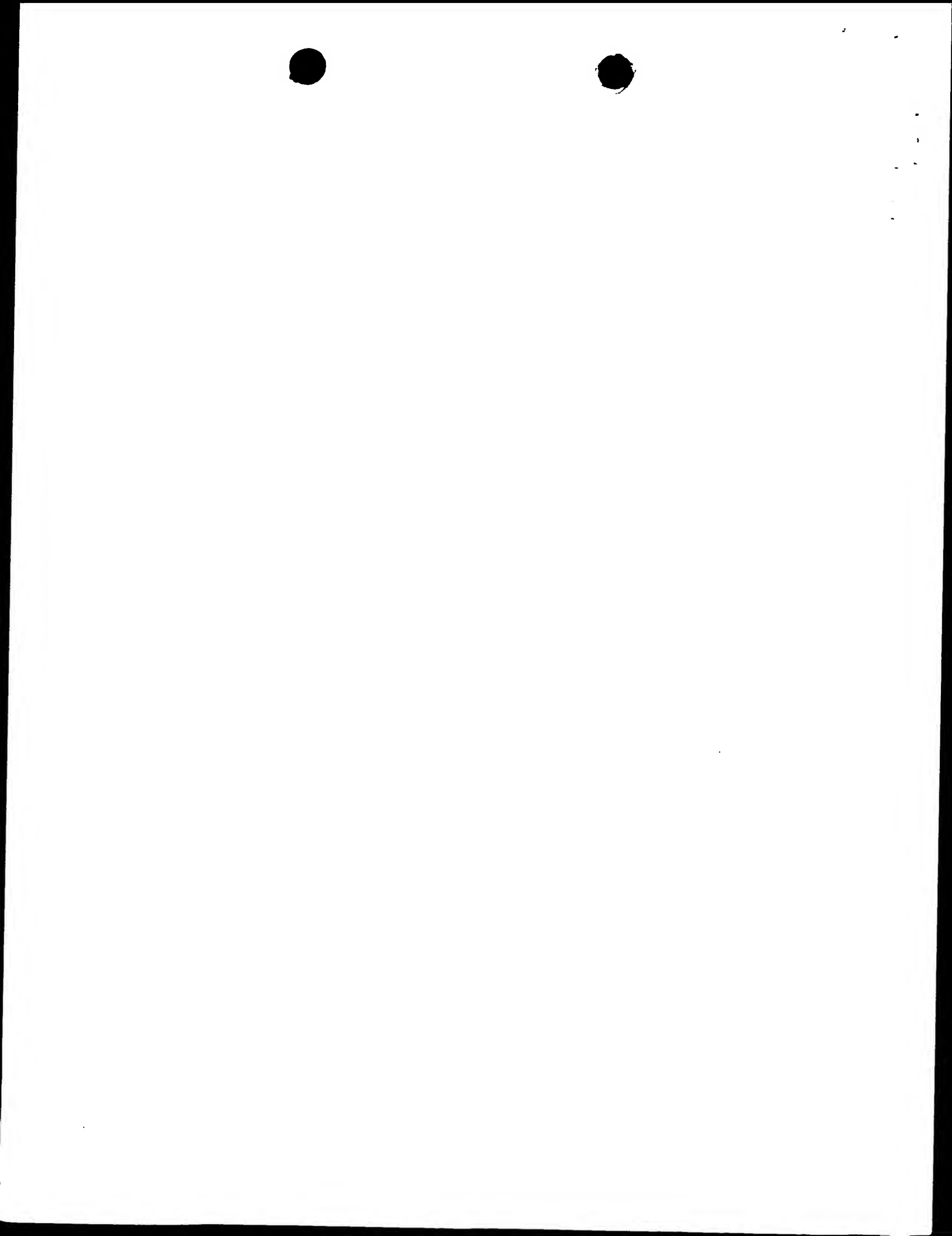
**Nationales Patent** (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- |   |   |
|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AE</b> Vereinigte Arabische Emirate      | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LR</b> Liberia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AL</b> Albanien                          | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LS</b> Lesotho   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AM</b> Armenien                          | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LT</b> Litauen   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AT</b> Österreich                        | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LU</b> Luxemburg                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AU</b> Australien                        | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LV</b> Lettland  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AZ</b> Aserbaidshan                      | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MA</b> Marokko   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BA</b> Bosnien-Herzegowina               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MD</b> Republik Moldau                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BB</b> Barbados                          | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MG</b> Madagaskar                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BG</b> Bulgarien                         | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MK</b> Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BR</b> Brasilien                         | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MN</b> Mongolei  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BY</b> Belarus                           | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MW</b> Malawi  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CA</b> Kanada                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MX</b> Mexiko  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CH und LI</b> Schweiz und Liechtenstein  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NO</b> Norwegen  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CN</b> China                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NZ</b> Neuseeland                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CR</b> Costa Rica                        | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PL</b> Polen   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CU</b> Kuba                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PT</b> Portugal  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CZ</b> Tschechische Republik             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RO</b> Rumänien  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DE</b> Deutschland                       | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RU</b> Russische Föderation                            |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DK</b> Dänemark                          | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SD</b> Sudan   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DM</b> Dominica                          | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SE</b> Schweden  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>EE</b> Estland                           | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SG</b> Singapur  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ES</b> Spanien                           | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SI</b> Slowenien                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>FI</b> Finnland                          | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SK</b> Slowakei  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GB</b> Vereinigtes Königreich            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SL</b> Sierra Leone                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GD</b> Grenada                           | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TJ</b> Tadschikistan                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GE</b> Georgien                          | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TM</b> Turkmenistan                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GH</b> Ghana                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TR</b> Türkei  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GM</b> Gambia                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TT</b> Trinidad und Tobago                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HR</b> Kroatien                          | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TZ</b> Vereinigte Republik Tansania                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HU</b> Ungarn                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UA</b> Ukraine   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ID</b> Indonesien                        | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UG</b> Uganda  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IL</b> Israel                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>US</b> Vereinigte Staaten von Amerika                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IN</b> Indien                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UZ</b> Usbekistan                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IS</b> Island                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>VN</b> Vietnam   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>JP</b> Japan                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>YU</b> Jugoslawien                                     |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KE</b> Kenia                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZA</b> Südafrika                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KG</b> Kirgisistan                       | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZW</b> Simbabwe  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KP</b> Demokratische Volksrepublik Korea |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KR</b> Republik Korea                    |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KZ</b> Kasachstan                        |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LC</b> Saint Lucia                       |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LK</b> Sri Lanka                         |   |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten, die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

[ ..... ]  
[ ..... ]

**Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen:** Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung (einschließlich der Gebühren) muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)



| Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRÜCHE                      |                                     | <input type="checkbox"/> Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben. |                                     |                                      |
|--|-------------------------------------|--|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr) | Aktenzeichen der früheren Anmeldung | Ist die frühere Anmeldung eine:  |                                     |                                      |
|  |                                     | nationale Anmeldung: Staat   | regionale Anmeldung: regionales Amt | internationale Anmeldung: Anmeldeamt |
| Zeile (1)<br>21. September 99<br>(21.09.99)          | 199 45 171.0                        | DE   |                                     |                                      |
| Zeile (2)<br>26. Oktober 99<br>(26.10.99)            | 199 51 543.3                        | DE   |                                     |                                      |
| Zeile (3)<br>23. Dezember 99<br>(23.12.99)           | 199 62 508.5                        | DE   |                                     |                                      |

☐ Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist(sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist)

\* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.

### Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

**Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA)**  
(falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden):

**Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche** (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist):

ISA /

Datum (Tag/Monat/Jahr) Aktenzeichen Staat (oder regionales Amt)

### Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE

Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern:

Antrag : 4  
Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) : 21  
Ansprüche : 4  
Zusammenfassung : 1  
Zeichnungen : 2  
Sequenzprotokollteil der Beschreibung : 4  
Blattzahl insgesamt : 36

Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

- ☐ Blatt für die Gebührenberechnung
- ☐ Gesonderte unterzeichnete Vollmacht
- ☐ Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden):
- ☐ Begründung für das Fehlen einer Unterschrift
- ☐ Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet:
- ☐ Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache:
- ☐ Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material
- ☒ Protokoll der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form
- ☐ Sonstige (einzeln auflisten):

**Abbildung der Zeichnungen**, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.):

**Sprache**, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird: deutsch

### Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

*Dr. Werner Behnisch*

Dr. Werner BEHNISCH  
(Patentanwalt für Anmelder)

|  |              |  |                                     |
|--|--------------|--|-------------------------------------|
| Vom Anmeldeamt auszufüllen   |              | 20 SEP 2000  |                                     |
| 1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:  | (20.09.2000) | 2. Zeichnungen eingegangen:  | <input checked="" type="checkbox"/> |
| 3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung: |              | nicht eingegangen:   | <input type="checkbox"/>            |
| 4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:   |              | 6. <input checked="" type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben |                                     |
| 5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind):   | ISA /        |  |                                     |

|  |  |
|--|--|
| Vom Internationalen Büro auszufüllen                             |  |
| Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro: |  |





(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
29. März 2001 (29.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/22083 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/10,  
G01N 33/50

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/09217

(22) Internationales Anmeldedatum:  
20. September 2000 (20.09.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 45 171.0 21. September 1999 (21.09.1999) DE  
199 51 543.3 26. Oktober 1999 (26.10.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): GSF-FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT UND GESUNDHEIT GMBH [DE/DE]; Ingolstädter Landstrasse 1, 85764 Oberschleissheim (DE). ARTEMIS PHARMACEUTICALS GMBH [DE/DE]; Neurather Ring 1, 51063 Köln (DE).

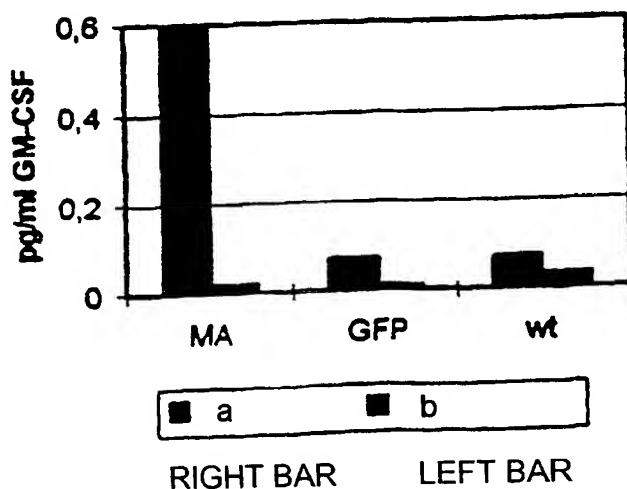
(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BORNKAMM, Georg, W. [DE/DE]; Otilostr. 6a, 81243 München (DE). HOBOM, Gerd [DE/DE]; Arndtstr. 14, 35392 Giessen (DE). MAUTNER, Josef [DE/DE]; Grütznerstr. 6, 81667

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING MHC-RESTRICTED ANTIGENS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON MHC-RESTRINGIERTEN ANTIGENEN

PRESENTATION OF THE MODEL ANTIGEN  
IN THE CONTEXT OF MHC II



a...WITH T-CELLS  
b...WITHOUT T-CELLS

(57) Abstract: The invention relates to a method for identifying MHC-restricted antigens. The inventive method comprises the following steps: (a) producing a gene bank or a cDNA bank from a cell to be analysed or a micro-organism to be analysed; (b) introducing the cDNA or DNA of the gene bank into the genome of retroviruses or in the form of additional vRNA of modified influenza viruses with a higher transcription, replication and/or expression rate than the wild type, in order to obtain recombinant virus particles; (c) infecting immortalised autologous cells which express MHC class I and/or MHC class II molecules on their surface with the recombinant virus particles obtained in step (b); (d) expressing proteins coded for by the cDNA or the DNA of the gene bank in the autologous cells and presenting the cleavage products of these proteins produced by the autologous cell on the cell surface in conjunction with MHC molecules; (e) co-cultivating T-cells with the autologous cells; (f) stimulating the T-cells with such autologous cells as present an antigen on their cell surface that is recognised by the T-cells; (g) separation of the clones that express the antigen and identification of the antigen.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Identifizierung von MHC-restringierten Antigenen.

Die nachfolgenden Schritte werden dabei vom erfindungsgemässen Verfahren mitumfasst:  
(a) Herstellen einer Genbank oder cDNA-Bank aus einer zu untersuchenden Zelle oder einem zu untersuchenden Mikroorganismus;  
(b) Einbringender cDNA oder DNA der Genbank

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/22083 A3



München (DE). NIMMERJAHN, Falk [DE/DE]: Dr. Pollmannstr. 6, 95349 Thurnau (DE).

europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(74) **Anwalt:** BEHNISCH, Werner; Reinhard, Skuhra, Weise & Partner GbR. Postfach 44 01 51, 80750 München (DE).

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:**

11. Oktober 2001

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

in das Genom von Retroviren oder als zusätzliche vRNA von modifizierten Influenzaviren, die eine erhöhte Transkriptions-, Replikations- und/oder Expressionsrate relativ zu dem Wildtyp aufweisen um rekombinante Viruspartikel zu erhalten; (c) Infizieren von immortalisierten autologen Zellen, die MHC Klasse I- und/oder MHC Klasse II-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, mit den in Schritt (b) erhaltenen rekombinanten Viruspartikeln; (d) Exprimieren von durch die cDNA oder die DNA der Genbank codierten Proteinen in den autologen Zellen und Präsentieren der von der autologen Zelle erzeugten Spaltprodukte dieser Proteine auf der Zelloberfläche in Verbindung mit MHC Molekülen; (e) Co-Kultivieren von T-Zellen mit den autologen Zellen; (f) Stimulieren der T-Zellen durch solche autologen Zellen, die ein durch die T-Zellen erkanntes Antigen auf ihrer Zelloberfläche präsentieren; (g) Vereinzelung der Klone, die das Antigen exprimieren, und Identifizierung des Antigens.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP00/09217

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12N15/10 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)  
EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE, WPI Data, PAJ

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X          | WANG RONG-FU ET AL: "Development of a retrovirus-based complementary DNA expression system for the cloning of tumor antigens."<br>CANCER RESEARCH,<br>vol. 58, no. 16,<br>15 August 1998 (1998-08-15), pages<br>3519-3525, XP002107625<br>ISSN: 0008-5472<br>cited in the application | 1-4,6,<br>8-16        |
| Y          | the whole document  | 1-4,6,<br>8-16        |
| Y          | WO 99 41383 A (MAXYGEN INC)<br>19 August 1999 (1999-08-19)<br>abstract<br>page 63 -page 64<br>page 103 -page 104, line 20<br>---<br>-/-   | 1-4,6,<br>8-16        |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 April 2001

Date of mailing of the international search report

26/04/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gundlach, B

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/09217

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A          | WO 97 34143 A (GABATHULER REINHARD<br>;JEFFERIES WILFRED A (CA); KOLAITIS<br>GERASSIMOS) 18 September 1997 (1997-09-18)<br>the whole document<br>---  | 1-10,<br>13-16        |
| A          | ROSENBERG S A ET AL: "A NEW ERA FOR<br>CANCER IMMUNOTHERAPY BASED ON THE GENES<br>THAT ENCODE CANCER ANTIGENS"<br>IMMUNITY, CELL PRESS, US,<br>vol. 10, no. 3, March 1999 (1999-03),<br>pages 281-287, XP000918298<br>ISSN: 1074-7613<br>cited in the application<br>page 281, left-hand column, paragraph 3<br>--- | 1-16                  |
| P, X       | WO 00 28016 A (UNIV ROCHESTER)<br>18 May 2000 (2000-05-18)<br>the whole document<br>-----   | 1-16                  |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/09217

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9941383 A                              | 19-08-1999          | AU 2674199 A               | 30-08-1999          |
|   |                     | AU 2674299 A               | 30-08-1999          |
|   |                     | AU 3289199 A               | 30-08-1999          |
|   |                     | AU 3291099 A               | 30-08-1999          |
|   |                     | EP 1053312 A               | 22-11-2000          |
|   |                     | EP 1053343 A               | 22-11-2000          |
|   |                     | EP 1056842 A               | 06-12-2000          |
|   |                     | EP 1054973 A               | 29-11-2000          |
|   |                     | WO 9941368 A               | 19-08-1999          |
|   |                     | WO 9941369 A               | 19-08-1999          |
|   |                     | WO 9941402 A               | 19-08-1999          |
| WO 9734143 A                              | 18-09-1997          | US 5792604 A               | 11-08-1998          |
|   |                     | AU 2088997 A               | 01-10-1997          |
|   |                     | CA 2248651 A               | 18-09-1997          |
|   |                     | EP 0888540 A               | 07-01-1999          |
|   |                     | JP 2000506973 T            | 06-06-2000          |
|   |                     | US 5845028 A               | 01-12-1998          |
| WO 0028016 A                              | 18-05-2000          | AU 1397799 A               | 29-05-2000          |



12

13

14

15

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen

PCT/E 00/09217

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12N15/10 G01N33/50

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C12N G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE, WPI Data, PAJ

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X          | WANG RONG-FU ET AL: "Development of a retrovirus-based complementary DNA expression system for the cloning of tumor antigens."<br>CANCER RESEARCH,<br>Bd. 58, Nr. 16,<br>15. August 1998 (1998-08-15), Seiten<br>3519-3525, XP002107625<br>ISSN: 0008-5472<br>in der Anmeldung erwähnt<br>das ganze Dokument | 1-4,6,<br>8-16     |
| Y          |  | 1-4,6,<br>8-16     |
| Y          | WO 99 41383 A (MAXYGEN INC)<br>19. August 1999 (1999-08-19)<br>Zusammenfassung<br>Seite 63 -Seite 64<br>Seite 103 -Seite 104, Zeile 20<br>---<br>-/-   | 1-4,6,<br>8-16     |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- \*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. April 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

26/04/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beiensteier

Gundlach, B

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|-----------|--|--------------------|
| A         | WO 97 34143 A (GABATHULER REINHARD<br>;JEFFERIES WILFRED A (CA); KOLAITIS<br>GERASSIMOS)<br>18. September 1997 (1997-09-18)<br>das ganze Dokument<br>---   | 1-10,<br>13-16     |
| A         | ROSENBERG S A ET AL: "A NEW ERA FOR<br>CANCER IMMUNOTHERAPY BASED ON THE GENES<br>THAT ENCODE CANCER ANTIGENS"<br>IMMUNITY, CELL PRESS, US,<br>Bd. 10, Nr. 3, März 1999 (1999-03), Seiten<br>281-287, XP000918298<br>ISSN: 1074-7613<br>in der Anmeldung erwähnt<br>Seite 281, linke Spalte, Absatz 3<br>--- | 1-16               |
| P,X       | WO 00 28016 A (UNIV ROCHESTER)<br>18. Mai 2000 (2000-05-18)<br>das ganze Dokument<br>-----   | 1-16               |



## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur Patentfamilie gehören

Internationale Aktenzeichen

PCT/E 0/09217

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 9941383 A                                       | 19-08-1999                    | AU 2674199 A                      | 30-08-1999                    |
|  |                               | AU 2674299 A                      | 30-08-1999                    |
|  |                               | AU 3289199 A                      | 30-08-1999                    |
|  |                               | AU 3291099 A                      | 30-08-1999                    |
|  |                               | EP 1053312 A                      | 22-11-2000                    |
|  |                               | EP 1053343 A                      | 22-11-2000                    |
|  |                               | EP 1056842 A                      | 06-12-2000                    |
|  |                               | EP 1054973 A                      | 29-11-2000                    |
|  |                               | WO 9941368 A                      | 19-08-1999                    |
|  |                               | WO 9941369 A                      | 19-08-1999                    |
|  |                               | WO 9941402 A                      | 19-08-1999                    |
| WO 9734143 A                                       | 18-09-1997                    | US 5792604 A                      | 11-08-1998                    |
|  |                               | AU 2088997 A                      | 01-10-1997                    |
|  |                               | CA 2248651 A                      | 18-09-1997                    |
|  |                               | EP 0888540 A                      | 07-01-1999                    |
|  |                               | JP 2000506973 T                   | 06-06-2000                    |
|  |                               | US 5845028 A                      | 01-12-1998                    |
| WO 0028016 A                                       | 18-05-2000                    | AU 1397799 A                      | 29-05-2000                    |



1  
2  
3

4  
5  
6

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
29. März 2001 (29.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/22083 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **G01N 33/53**

München (DE). NIMMERJAHN, Falk [DE/DE]; Dr.  
Pollmannstr. 6, 95349 Thurnau (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/09217**

(74) Anwalt: **BEHNISCH, Werner; Reinhard, Skuhra, Weise  
& Partner GbR**, Postfach 44 01 51, 80750 München (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
20. September 2000 (20.09.2000)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:  
199 45 171.0 21. September 1999 (21.09.1999) DE  
199 51 543.3 26. Oktober 1999 (26.10.1999) DE  
199 62 508.5 23. Dezember 1999 (23.12.1999) DE

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **GSF-FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT UND GESUNDHEIT GMBH** [DE/DE]; Ingolstädter Landstrasse 1, 85764 Oberschleissheim (DE). **ARTEMIS PHARMACEUTICALS GMBH** [DE/DE]; Neurather Ring 1, 51063 Köln (DE).

Veröffentlicht:  
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **BORNKAMM, Georg, W.** [DE/DE]; Otilostr. 6a, 81243 München (DE). **HOBOM, Gerd** [DE/DE]; Arndtstr. 14, 35392 Giessen (DE). **MAUTNER, Josef** [DE/DE]; Grütznerstr. 6, 81667

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: **METHOD FOR IDENTIFYING MHC-RESTRICTED ANTIGENS**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON MHC-RESTRINGIERTEN ANTIGENEN**

(57) Abstract: The invention relates to a method for identifying MHC-restricted antigens.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Identifizierung von MHC-restringierten Antigenen.



## VERFAHREN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON MHC-RESTRINGIERTEN ANTIGENEN

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung von MHC-restringierten T-Zell-Antigenen.

Zwei Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung bilden die konzeptionelle Basis der gegenwärtigen Tumorimmunologie: 1. Die Tumorentstehung ist Folge genetischer Veränderungen der Zelle, die zur Expression aberranter Genprodukte führen. 2. T-Zellen sind in der Lage, solche Veränderungen im Proteinmuster entarteter Zellen zu erkennen. Voraussetzung für die Induktion einer antitumoralen Immunantwort ist die Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen. Die molekulare Identifizierung von T-Zell-Tumorantigenen schafft demnach die Voraussetzung für die Entwicklung Antigen-spezifischer Vakzinen sowie anderer Formen T-Zell-vermittelter Immuntherapien (Rosenberg, 1996, 1999).

In den letzten Jahren wurden insbesondere beim malignen Melanom mehrere Antigene identifiziert, die von autologen T-Zellen der Patienten erkannt werden. Ein möglicher therapeutischer Nutzen dieser Antigene wird momentan im Rahmen klinischer Studien untersucht. Für eine breite klinische Anwendung ist es allerdings notwendig, möglichst viele Tumorantigene zu identifizieren, denn: 1. Die bisher bekannten Antigene werden in der Regel nur in einem kleinen Prozentsatz aller malignen Melanome exprimiert und sind somit nur bei einem kleinen Patientenkollektiv anwendbar. 2. Da Antigene als Peptide von HLA-Molekülen

präsentiert werden und HLA-Moleküle in der menschlichen Population hochpolymorph sind, muß man möglichst viele Antigene identifizieren, um für jede HLA-Konstellation Antigene zur Vakzinierung zur Verfügung zu haben. 3. Vakzinierungen mit nur einem Antigen führen häufig zur Abschaltung dieses Antigens durch den Tumor und damit zur Resistenzentwicklung. Solcher Resistenzentwicklung soll durch eine gleichzeitige Vakzinierung mit möglichst vielen Antigenen vorgebeugt werden. Die Identifizierung weiterer Tumorantigene beim Melanom als auch bei anderen Tumoren ist somit zwingende Voraussetzung für erfolgreiche Immuntherapien.

Experimentell setzt sich die Identifizierung von Tumorantigenen aus zwei Teilschritten zusammen. Erstens, der Isolierung Tumor-spezifischer T-Zellen des Patienten durch wiederholte in vitro Stimulation mit autologen Tumorzellen, und zweitens, der molekularen Identifikation der von den T-Zellen erkannten Antigene. Hierfür ist ein einfaches und allgemein anwendbares Verfahren wünschenswert.

Aus dem Stand der Technik sind bereits einige Methoden zur Identifizierung von MHC-restringierten T-Zell Antigenen bekannt. Die bekannten Lösungsansätze umfassen insbesondere die folgenden Verfahren (Rosenberg, 1999):

Transiente Transfektion von allophenen oder xenophenen Zelllinien;  
Elution und HPLC Fraktionierung MHC gebundener Peptide;  
Retrovirale Transduktion von autophen Fibroblasten.

Diese Methoden und die damit verbundenen Nachteile werden nachfolgend näher dargestellt.

#### 1. Transiente Transfektion von allophenen/xenophenen Zelllinien

Diese Methode beruht auf der Expression von cDNA Banken aus Tumoren in etablierten Zelllinien (Boon, 1993). Als Zielzellen werden hierfür 293 oder COS-7 Zellen verwendet, die sich sehr effizient transfizieren lassen. Bezogen auf den HLA Genotyp des jeweiligen Patienten handelt es sich dabei allerdings um allogene (293) bzw. xenogene (COS-7) Zelllinien. Da T-Zellen MHC-restringent sind, d.h. Antigen nur in Verbindung mit einem entsprechenden MHC-Molekül erkennen, ist die Kenntnis der Restriktionselemente

notwendige Voraussetzung für eine Identifizierung von Antigenen. Eine T-Zell Erkennung der eingebrachten Antigene wird nur über die Co-Transfektion des jeweiligen Restriktionselements ermöglicht. Die Identifizierung des jeweiligen Restriktionselements ist aber oftmals schwierig oder gar unmöglich. Da die verwendeten Zielzellen darüber hinaus MHC Klasse II negativ sind, ist diese Methode auf die Identifizierung von MHC Klasse I-restringierten Antigenen mit bekanntem Restriktionselement beschränkt.

## 2. Biochemische Identifikation des Antigens

Neben der Expressionsklonierung ist eine Identifikation von MHC Klasse I-restringierten Tumorantigenen auch auf biochemischem Wege möglich (Cox et al., 1994). Dazu werden Tumorzellen lysiert und die restringierenden MHC Moleküle mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern immunpräzipitiert. Aus diesen MHC Molekülen werden die daran gebundenen Peptide eluiert und über reverse phase HPLC aufgetrennt. Anschließend werden Zielzellen mit den einzelnen Peptid-Fractionen beladen. Diese Zielzellen zeichnen sich dadurch aus, daß sie nur das jeweilige Restriktionselement in Peptid-ungebundener Form exprimieren. Die exogene Zugabe von Peptiden führt deshalb rasch zu einer Bindung durch die "leeren" MHC Moleküle. Durch Co-Kultivierung dieser Peptid-beladenen Zielzellen mit tumorspezifischen T-Zellen werden positive Fractionen identifiziert und über die Peptid-Sequenz das Antigen ermittelt. Wie bereits unter 1, so ist auch hier die Kenntnis des HLA-Restriktionselements unabdingbare Voraussetzung für die Identifizierung von T-Zell-Antigenen, und zwar erstens für die Immunpräzipitation der restringierenden MHC Moleküle und zweitens für die Beladung entsprechender Zielzellen mit den eluierten Peptiden. Ein zusätzlicher Nachteil liegt in der enorm großen Tumormenge, die für die Peptid-Gewinnung benötigt wird, so daß diese Methode nur bei Tumoren angewendet werden kann, die sich gut in vitro kultivieren und expandieren lassen. Eine Identifizierung von T-Zell-Antigenen ist auch bei dieser Methode auf MHC Klasse I-restringierte Antigene beschränkt, da eine analoge HPLC Fraktionierung von MHC Klasse II-Peptiden durch deren Längen-Heterogenität unmöglich ist.

## 3. Retrovirale Transduktion autologer Fibroblasten

Das oben beschriebene Problem der notwendigen Identifikation des Restriktionselements

wird hinfällig, wenn autologe Zielzellen für die Expression der cDNA Bank aus dem Tumor verwendet werden. Für die Durchführung eines Antigen-Screenings werden große Zellmengen benötigt, so daß als Zielzellen nur solche Zellen des Patienten in Frage kommen, die sich in vitro entsprechend expandieren lassen. Fibroblasten lassen sich aus kleinen Hautbiopsien gewinnen und zudem sehr gut retroviral transduzieren. Die Identifikation von MHC Klasse I-restringierten Antigenen durch die retrovirale Transduktion autologer Fibroblasten mit cDNAs aus Tumoren wurde deshalb als Methode vorgestellt, welche die Definition des Restriktionselements überflüssig machen soll (Wang et al., 1998). Diese Methode ist allerdings mit einigen Nachteilen behaftet. Primäre Fibroblasten können nur eine begrenzte Anzahl an Passagen in vitro kultiviert werden. Da Fibroblasten außerdem kein MHC Klasse II exprimieren, ist auch diese Methode auf die Identifizierung von MHC Klasse I-restringierten Antigenen beschränkt. Im Vergleich zur transienten Expressionsklonierung, wie unter 1 beschrieben, ist die retrovirale Transduktion der Zielzellen mit einem wesentlich größeren Arbeitsaufwand verbunden. Der Hauptnachteil dieser Methode ist allerdings in der vergleichsweise niedrigen Expression der retroviral eingebrachten Gene zu sehen. Dieses niedrige Expressionsniveau bedingt eine im Vergleich zur transienten Transfektion etwa 10-fach geringere Sensitivität und somit einen 10-fach höheren Screening-Aufwand.

Es ist eine Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren bereitzustellen, das die oben beschriebenen Nachteile des Standes der Technik vermeidet, insbesondere eine Kenntnis des restringierenden MHC Moleküls nicht erfordert, eine unbegrenzte Proliferation der Zielzellen erlaubt und gleichzeitig eine Identifizierung sowohl von MHC Klasse I- als auch MHC Klasse II-restringierten Antigenen ermöglicht.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das Verfahren nach Anspruch 1 gelöst. Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen, der nachfolgenden Beschreibung sowie den Ausführungsbeispielen und Abbildungen. Die Abbildungen zeigen:

Figur 1: LCL Infektion mit Influenza



Zur Bestimmung der Influenza Infektionsrate von LCL wurde die Zelllinie LCL 1.26 mit rekombinanten Influenza-Viren (FPV-1104 als Vektor) inkubiert, welche das Gen für das Green Fluorescence Protein unter der Kontrolle eines Promotors tragen, der sich durch eine verstärkte Aktivität gegenüber dem Wildtyp-Promotor auszeichnet (Promotor-Up-Variante). Nach 24 Stunden wurden die unter UV-Licht grün leuchtenden Zellen gezählt.

Figur 2: Präsentation des Modellantigens im Kontext von MHC Klasse II Molekülen nach Infektion mit rekombinantem Influenza-Virus. LCL 1.11 wurden mit Wildtyp (wt) bzw. rekombinanten FPV-Influenza Viren, die das Modellantigen unter der Kontrolle der Promotor-Up-Variante exprimieren, infiziert. Nach viraler Transduktion des Modellantigens (MA) in LCL 1.11 kommt es zu einer GM-CSF Freisetzung durch den Modellantigen--spezifischen T-Zell-Klon, nicht aber nach Wildtyp Virus (wt) Infektion oder nach Infektion mit GFP-Gen-tragenden Influenza Viren.

Figur 3: LCL Infektion mit Retroviren

$1 \times 10^5$  Zellen der EBV immortalisierten lymphoblastoiden Zelllinie LCL 1.26 wurden mit rekombinanten Retroviren infiziert, welche das green fluorescence protein exprimieren. 72 Stunden nach Infektion wurden die grün leuchtenden Zellen gezählt.

Figur 4: Präsentation des Modellantigens im Kontext von MHC Klasse II Molekülen nach Infektion mit rekombinanten Retroviren.

$1 \times 10^5$  Zellen der lymphoblastoiden Zelllinie LCL 1.11 wurden retroviral mit dem Neomycin Posphotransferase II Gen (Pinco-NeoR) bzw. mit dem Green Fluorescence Protein Gen (Pinco-GFP, Grignani et al., 1998) transduziert. 72 Stunden später wurden die infizierten bzw. nicht-infizierte LCL 1.11 Zellen mit  $1 \times 10^5$  T-Zellen inkubiert. Die verwendeten, MHC Klasse II restringierten T-Zellen sind spezifisch für ein auf HLA-DP3 präsentiertes Epitop des Neomycin Phosphotransferase II Proteins. Nach 24 stündiger Co-Kultivierung der Zellen wurde die GM-CSF Konzentration im Zellüberstand mittels eines ELISAs ermittelt.

Die vorliegende Erfindung schafft somit ein Verfahren zur Identifizierung von MHC-restringierten Antigenen, und zwar sowohl von MHC Klasse I und/oder Klasse II restringierten Antigenen. Die nachfolgenden Schritte werden dabei vom erfindungsgemäßen Verfahren mitumfaßt:

- (a) Herstellen einer Genbank oder cDNA-Bank aus einer zu untersuchenden Zelle oder einem zu untersuchenden Mikroorganismus;
- (b) Einbringen der cDNA oder DNA der Genbank in das Genom von Retroviren oder als zusätzliche vRNA von modifizierten Influenzaviren, die eine erhöhte Transkriptions-, Replikations- und/oder Expressionsrate relativ zu dem Wildtyp aufweisen, um rekombinante Viruspartikel zu erhalten;
- (c) Infizieren von immortalisierten autologen Zellen, die MHC Klasse I- und/oder MHC Klasse II-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, mit den in Schritt (b) erhaltenen rekombinanten Viruspartikeln;
- (d) Exprimieren von durch die cDNA oder die DNA der Genbank kodierten Proteinen in den autologen Zellen und Präsentieren der von der autologen Zelle erzeugten Spaltprodukte dieser Proteine auf der Zelloberfläche in Verbindung mit MHC Molekülen;
- (e) Co-Kultivieren von T-Zellen mit den autologen Zellen;
- (f) Stimulieren der T-Zellen durch solche autologen Zellen, die ein durch die T-Zellen erkanntes Antigen auf ihrer Zelloberfläche präsentieren;
- (g) Vereinzelung der Klone, die das Antigen exprimieren, und Identifizierung des Antigens.

Die Erfindung geht davon aus, daß aus einer Zelle, beispielsweise einer tierischen oder menschlichen Tumor-Zelle, deren mRNAs isoliert und daraus eine cDNA-Bank angelegt wird. Analog kann es sich auch um Zellen handeln, die mit einem Mikroorganismus infiziert

sind, beispielsweise einem Bakterium, einem Virus, einem Pilz oder einer Protozoe. Selbstverständlich sind auch mischinfizierte Zellen möglich. Alternativ zu der Herstellung einer cDNA-Bank aus der infizierten Zelle kann hier auch von einer Genbank ausgegangen werden, die direkt aus dem zu untersuchenden Mikroorganismus hergestellt würde. In einem nächsten Schritt wird die cDNA oder die DNA der Genbank in das Genom von Retroviren oder als zusätzliche vRNA in modifizierte Influenza-Viren eingebracht, wodurch rekombinante Retroviren bzw. Influenza-Viren entstehen. Als Retroviren werden bevorzugt amphotrope oder pseudotypisierte Retroviren eingesetzt. Die Herstellung rekombinanter Retroviren sowie Beispiele für amphotrope Retroviren sind in Kinsella et al. (1996), Beispiele für pseudotypisierte Retroviren in Miletic et al. (1999) beschrieben. Als weiteres Beispiel für Retroviren sei die Gruppe der Lentiviren genannt, wobei hier insbesondere HIV und SIV erwähnt werden sollen.

Als modifizierte Influenza-Viren werden bevorzugt Promotor-Up-Varianten von FPV Bratislava eingesetzt. Die Herstellung solcher Influenza-Viren mit Promotor-Up-Varianten ist in Neumann und Hobom (1995), Flick und Hobom (1999) sowie WO-A-96/10641 beschrieben.

Die genannten Influenza-Promotor-Up-Varianten weisen eine erhöhte Transkriptionsrate (sowohl mit dem vRNA Promoter als auch in dem cRNA Promoter der komplementären Sequenz) sowie eine erhöhte Replikations- und/oder Expressionsrate relativ zum Wildtyp auf und unterscheiden sich von dem Wildtyp dadurch, daß sie wenigstens ein Segment (eines der natürlich vorhandenen oder ein zusätzliches) aufweisen, in dem in den 5' und 3' konservierten Region des Wildtyps insgesamt bis zu 5 Nukleotide ausgetauscht sind. Vorzugsweise sind in der 12 Nukleotide langen 3' konservierten Region des Wildtyps die Nukleotide in Position 3 und 8 (von 3' Terminus gezählt) durch andere Nukleotide ersetzt, wobei die nun eingefügten Nukleotide ein Basenpaar bilden (Pos. 3:G, dann Pos. 8:C; Pos. 3:G, dann Pos. 8:G; usw.). Darüber hinaus kann ebenfalls noch das Nukleotid in der Position 5 der 3' konservierten Region (vom 3' Terminus aus gezählt) ausgetauscht sein.

Die 3' konservierten Regionen der Wildtyp-Influenzaviren weisen die folgenden Sequenzen auf:

Influenza A: (5')-CCUGCUUUUGCU-3'

Influenza B: (5')-NN(C/U)GCUUCUGCU-3'

Influenza C: (5')-CCUGCUUCUGCU-3'

Optional können auch noch Austausche in der 13 Nukleotide langen 5' konservierten Region des Wildtyps vorgenommen werden, z. B. in Position 3 und 8, wiederum vorausgesetzt, dass die nun eingefügten Nukleotide ein Basenpaar bilden. Die 5' konservierten Regionen der Wildtyp-Influenzaviren weisen die folgenden Sequenzen auf:

Influenza A: 5'-AGUAGAAACAAGG-3'

Influenza B: 5'-AGUAG(A/U)AACA(A/G)NN-3'

Influenza C: 5'-AGCAGUAGCAAG(G/A) -3':

Bevorzugt werden in der vorliegenden Erfindung solche Influenzavirus-Mutanten verwendet, in denen in der 3' konservierten Region die Austausche G3A und C8U vorgenommen werden. Am meisten bevorzugte Influenzavarianten sind Influenza-A-Mutanten und insbesondere solche, die noch den Austausch U5C aufweisen (die vorstehenden Mutationen sind vom 3' Ende ausgehend beziffert; solches Zählen vom 3' Ende wird auch durch eine Linie auf der Zahl gekennzeichnet, so z.B. G  $\bar{3}$ A). Weitere bevorzugte Influenzavarianten umfassen die Mutationen G3C, U5C und C8G (vom 3' Ende gezählt) in der 3'-terminalen Nukleotidsequenz, was die folgende 3'-terminale Nukleotidsequenz ergibt:

(5')-CCUGGUUCUCCU-3'.

Aus den vorstehend definierten Influenzaviren sind diejenigen besonders bevorzugt, die die folgende 3'-terminale Nukleotidsequenz aufweisen:

(5')-CCUGUUUCUACU-3'

Im Falle von modifizierten Influenza-A-Viren weist das modifizierte Segment vorzugsweise noch die Modifikationen U3A und A8U in seiner 5'-terminalen Sequenz auf, im Falle von Influenza-C-Viren kann es noch die Modifikationen C3U und G8A in seiner 5'-terminalen Sequenz aufweisen.

Die am meisten bevorzugten Influenza-Promoter-Up-Varianten der vorliegenden Erfindung weisen die folgenden allgemeinen Strukturen auf:

Influenza A (Promoter-Up-Variante "1104"):

5'-AGUAGAAACAAGGNNNU<sub>5-6</sub>...(880-2300 ntd)...N'N'N'CCUGUUUCuACU-3'

Influenza A (Promoter-Up-Variante "1920"):

5'-AGAAGAAUCAAGGNNNU<sub>5-6</sub>...(880-2300 ntd)...N'N'N'CCUGUUUCuACU-3'

Influenza A (Promoter-Up-Variante "1948"):

5'-AGUAGAAACAAGGNNNU<sub>5-6</sub>...(880-2300 ntd)...N'N'N'CCUGGUUCuCCU-3'

Influenza B:

5'-AGUAG(A/U)ACA(A/G)NNNNNU<sub>5-6</sub>...(880-2300 ntd)...N'N'N'N'(C/U)GUUUCUACU-3'

Influenza C:

5'-AGUAGUAACAAG(G/A)GU<sub>5-6</sub>... (880-2300 ntd)...CCCCUGUUUCUACU-3'

In diesen Strukturen gilt:

- 1) Unterstrichen (und größer) die notwendigen Mutationen gegenüber der Wildtypsequenz zur Erzeugung der Promoter-Up-Variante;
- 2) größeres nicht unterstrichen A in dem 5' Teil der Sequenz: überzähliges A (Position 10), winkelförmig;
- 3) (A/G) an einer Position: unterschiedliche Isolate bzw. Einzelsegmente mit verschiedener Sequenz jeweils an Positionen, die analytisch austauschbar sind;

- 4) N und N': unbestimmte, aber basengepaarte Positionen, komplementär zwischen 5' und 3' Ende, für verschiedene der acht Segmente unterschiedlich, jedoch jeweils konstant über alle Isolate;
- 5) (880-2300 ntd): die Segmentlänge der Virussegmente, bei Segmenten mit Fremdgen-Inhalt bis zu 4000 ntd.

Die rekombinanten Viren werden auf geeigneten Wirtszellen vermehrt und gegebenenfalls durch an sich bekannte Methoden isoliert. Mit diesen rekombinanten Retroviren bzw. Influenza-Viren werden dann immortalisierte autologe Zellen, bevorzugt B-Zellen oder dendritische Zellen, die MHC Klasse I- und/oder MHC Klasse II-Moleküle exprimieren, infiziert. Hieran schließen sich die Schritte d) bis g), wie oben beschrieben, an.

Erfindungsgemäß wird unter "autolog" die Herkunft der Zellen verstanden, d.h. die Zellen stammen aus demselben Individuum wie die T-Zellen, mit denen das Screening auf Antigenexpression durchgeführt wird.

Voraussetzung für die vorliegende Erfindung ist natürlich, daß T-Zellklone eingesetzt werden, die ein Antigen in bestimmten Zellen erkennen. Da die Identität des von den T-Zellen erkannten Antigens unbekannt ist, soll herausgefunden werden, welches Antigen von den T-Zellen erkannt wird. Die Verfügbarkeit der T-Zellklone sagt somit nichts über die Natur des Antigens aus. Beispielsweise geht man von T-Zellklonen aus, die eine Prostata-Karzinomlinie erkennen, nicht aber EBV-immortalisierte Zellen sowie Fibroblasten desselben Individuums. Ziel ist es nunmehr, mit Hilfe einer cDNA-Bank aus den Prostatakarzinomzellen, den autologen EBV-immortalisierten Zellen als Empfängerzellen für die cDNA-Bank und den spezifischen T-Zellklonen das noch unbekannte Antigen zu identifizieren.

Nachfolgend wird die Erfindung im einzelnen ausgeführt.

Der Erfindung vorausgegangen war die Etablierung von tumorspezifischen T-Zell-Klonen. Da T-Zellen Antigen nur in Verbindung mit MHC Molekülen erkennen, bei einigen Klonen

eine Identifizierung des restringierenden MHC Moleküls aber nicht möglich war, konnten bereits etablierte Methoden zur Identifizierung von T-Zell-Antigenen für diese Klone nicht angewendet werden. Da Zellen unterschiedlicher Gewebe eines Individuums identische MHC Moleküle exprimieren, wurde nach Möglichkeiten gesucht, autologe B-Zellen des Patienten als Empfängerzellen für die Expression von cDNA Banken aus dem Tumor nutzbar zu machen. B-Zellen von jedem beliebigen Individuum können mit Epstein-Barr Virus, einem humanen Vertreter der Lymphocryptovirus-Gruppe oder verwandten Primaten-Viren dieser Gruppe infiziert, immortalisiert und in praktisch unbegrenzter Menge als sog. lymphoblastoide Zelllinien (LCL) verfügbar gemacht werden. Die Verwendung von autologen LCL als Zielzellen erübrigt die teilweise schwierige bis unmögliche Identifizierung der MHC Restriktionselemente. Da LCL konstitutiv MHC Klasse I und Klasse II exprimieren, ist sowohl eine Identifikation von MHC Klasse I-restringierten Antigenen, die von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden, als auch von MHC Klasse II-restringierten Antigenen, die von T-Helferzellen erkannt werden, möglich.

Die Verwendung von autologen LCL des Patienten als Zielzellen setzt allerdings einen effizienten Gentransfer in diese Zellen voraus, der bisher weder durch chemische noch physikalische Transfektionsmethoden erzielt werden konnte. Über die Infektionsrate von LCL mit Viren ist vergleichsweise wenig bekannt. Wie im folgenden beschrieben, wird durch die Verwendung von modifizierten Influenza A Viren erstens eine einzigartig effiziente Infektion von LCL erreicht, zweitens kommt es durch die Verwendung der transkriptionsaktivierten viruseigenen regulatorischen Elemente in den FPV-Virusvarianten zu einer unübertroffen hohen Genexpression der eingebrachten Erbinformation, was eine hohe Sensitivität und somit Einfachheit des Nachweises bedingt.

Die hier beschriebene Nutzung von Influenza A Virus-abgeleiteten Vektoren für den Gentransfer in LCL setzte eine Bestimmung der Infektionseffizienz voraus. Wie in Abbildung 1 gezeigt, werden bis zu 80% der lymphoblastoiden Zelllinien LCL1.26 mit diesen Viren infiziert.

Neben einer hohen Infektionsrate mußte für die beabsichtigte Anwendung eine Reihe weiterer Voraussetzungen erfüllt sein, damit eine Nutzung des Influenza Virussystems zum genannten Zweck möglich wird.

1. Expressionsniveau des eingebrachten Fremdgens?

Für eine hohe Sensitivität des Nachweisverfahrens ist eine hohe Expressionsrate der in die Zellen eingebrachten Fremdsequenz essentiell. Durch die Nutzung der influenza-viralen Transkriptions/Translations-Maschinerie konnte, wie in Western Analysen für ein Modellantigen nachgewiesen, eine etwa 5-fach höhere Expressionsrate als nach transienter Transfektion und ein etwa 10-fach höheres Expressionsniveau als nach retroviraler Transduktion erzielt werden.

2. Virale Interferenz mit Antigen-Präsentation und -Erkennung?

Für mehrere Viren ist bekannt, daß sie mit der Antigenpräsentation interferieren und so einer Immunerkennung entgehen. Um für das verwendete Influenza A Virus analoge Mechanismen auszuschließen, wurde ein für ein Modellantigen kodierendes Gen in die FPV-Viren eingebracht und LCLs damit infiziert. Die MHC Präsentation des Modellantigens wurde durch einen Modellantigen-spezifischen T-Zell-Klon ermittelt. Wie in Abbildung 2 gezeigt, interferiert Influenza Virus nicht mit der Präsentation des Antigens. Darüber hinaus kommt es durch die Influenza Virus-Infektion weder zu einer unspezifischen T-Zell-Aktivierung noch zu einer Zytokinfreisetzung durch die infizierten LCL.

3. Infektion der T Zellen?

Der Nachweis einer T-Zell-Aktivierung setzt eine mindestens 20-stündige Co-Kultivierung von Zielzellen und T-Zellen voraus. Eine mögliche Infektion von T-Zellen durch die verwendeten Influenza Viren (aus dem Überstand oder freigesetzt aus LCL) und eine nach 8 Stunden einsetzende Lyse der Zellen würde den Nachweis einer spezifischen T-Zell-Aktivierung unmöglich machen. Wie ebenfalls mit Hilfe des Green Fluorescence Protein



(GFP) nachgewiesen werden konnte, infizieren die verwendeten Influenzaviren die T-Zellen nicht oder zumindest nicht produktiv, d.h. virale Gene werden nicht exprimiert.

Zur Bestimmung der Influenza-Infektionsrate von LCL wurde die Zelllinie LCL 1.26 mit rekombinanten Influenza-Viren inkubiert, welche das Gen für das Green Fluorescence Protein tragen. Nach 24 Stunden wurden die unter UV Licht grün leuchtenden Zellen gezählt.

Als mögliche Alternative zum Gentransfer durch rekombinante Influenza Viren kamen auch rekombinante Retroviren in Betracht und wurden deshalb in unsere Untersuchungen mit einbezogen. Eine sehr gute Effizienz des Gentransfers ließ sich, wie in Abbildung 3 gezeigt, auch mit rekombinanten Retroviren erreichen. Mit Hilfe von Modellantigenen konnte auch mit rekombinanten Retroviren eine Antigen-spezifische T-Zell-Stimulation nachgewiesen werden (Abbildung 4). Allerdings erreichen Retroviren nicht das hohe Expressionsniveau von Influenza Viren.

Nachfolgend wird die Erfindung allgemein dargestellt.

Ausgangspunkt des Verfahrens der Erfindung ist die Isolierung von mRNA oder von DNA aus Zellen, deren Antigene einer Untersuchung unterzogen werden sollen. Hierzu werden, insbesondere Zellen humanen Ursprungs eingesetzt, wiewohl jedoch auch Zellen tierischen Ursprungs, beispielsweise aus Nagern wie Mäusen oder Ratten, verwendbar sind. Bevorzugt handelt es sich um Zellen aus einem Patienten, der an einem Tumor leidet, z. B. einem Tumor des blutbildenden Systems wie einem B Zell Tumor, z. B. einer Leukämie. Das Verfahren läßt sich jedoch auch für die Identifizierung von Autoantigenen oder von Fremdanitgenen anwenden, z.B aus mikrobiell infiziertem Gewebe (Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen sowie jede beliebige Mischinfektion). Handelt es sich dabei um einen bekannten Mikroorganismus, so kann dessen Erbinformation (in Form von RNA oder genomischer DNA) auch direkt verwendet werden.

Die Isolierung der mRNA oder der DNA erfolgt durch an sich bekannte molekularbiologische Methoden. Verwiesen sei hier beispielsweise auf Sambrook et al., (1989). Die mRNA wird anschließend durch ebenfalls bekannte Techniken in ihre cDNA umgeschrieben, um eine

cDNA-Bank der Zelle zu gewinnen. Es wird hier auf die obige, beispielhaft genannte Veröffentlichung verwiesen.

Die im Gemisch der cDNA- oder DNA-Fragmente enthaltene genetische Information wird nunmehr in das Genom von Influenza-Viren eingebracht. Die Vorgehensweise ist allgemein dargestellt wie folgt:

Die genetische Information für die von Influenza A Viren kodierten Proteine befindet sich auf 8 Negativ-Strang RNAs, wobei die kodierenden Bereiche jeweils von den Virus-spezifischen Promotor- und Terminationssequenzen flankiert werden, die sowohl die Transkription und die Replikation als auch die Verpackung der vRNAs in die Viruspartikel steuern.

Die Herstellung rekombinanter Influenza-Viren, d.h. die Verpackung eines Fremdgens in Influenza A Viruspartikel, und die Expression dieses Gens nach Infektion einer Zielzelle setzt voraus, daß dieses Gen erstens als Negativ-Strang RNA vorliegt und zweitens die viralen Promotor- bzw. Verpackungssignale trägt. Dies kann beispielsweise erreicht werden durch die Verwendung eines Plasmid-Vektors, der neben einem Resistenzgen, beispielsweise für Ampicillin, und einem bakteriellen Replikationsursprung zusätzlich eine Polylinker-Sequenz besitzt, die unmittelbar beiderseits von den nicht-translatierten (cDNA) Promotorsequenzen von Influenza A Virus flankiert wird, jedoch in modifizierter Form, die zur Aktivitätssteigerung des Promotors führt. Die viralen 5' und 3' Promotorsequenzen sind ihrerseits von den Sequenzen des humanen RNA Polymerase I Promotors und Terminators umgeben, die aus der humanen rDNA isoliert wurden.

Zur Erstellung einer cDNA Bank werden die cDNAs aus dem zu untersuchenden Gewebe in die Polylinker-Sequenz dieses Plasmids in inverser Orientierung bezüglich des RNA Polymerase I Promotors kloniert und in E.coli amplifiziert. Nach transienter Transfektion dieser Plasmide in geeignete Zielzellen entstehen durch die transkriptionelle Aktivität von RNA Polymerase I aus den einklonierten cDNAs pseudovirale negativ-Strang RNAs, die an ihren Enden die viralen Transkriptions- und Verpackungssignale tragen. Da die Verpackung der viralen RNAs in Viruspartikel nicht von der kodierenden Region, sondern ausschließlich

von den regulatorischen Signalsequenzen am 5'- und 3'-Ende abhängt, werden diese pseudoviralen RNAs nach Überinfektion der transfizierten Zellen mit Influenza A Helfer-Virus (FPV Bratislava) in die neugebildeten Viruspartikel aufgenommen, die in den Kulturüberstand abgegeben werden. Die in den Zellkulturüberstand freigesetzten Viren werden geerntet und wahlweise weiter konzentriert. Selbstverständlich sind auch andere dem Fachmann bekannte oder von ihm im Rahmen der Versuche zu konstruierende Vektoren, die auf Influenza-Viren, aber auch auf den nachfolgend beschriebenen Retroviren beruhen, im Rahmen der Erfindung einsetzbar.

In einem nächsten Schritt werden autologe B-Zellen mit den rekombinanten Viruspartikeln, die eine oder mehrere Kopien von cDNAs als Negativ-Strang vRNAs enthalten, infiziert. Die B-Zellen müssen vor der Infektion immortalisiert werden, wobei bevorzugt EBV-Gene eingesetzt werden. Es sind aber auch andere Immortalisierungssysteme bekannt, so z. B. Onkogene. Hierbei wird wie folgt vorgegangen:

Aus dem peripheren Blut des Spenders werden Lymphozyten (PBL) über einen Ficoll-Gradienten aufgereinigt und mit EBV-haltigem Zellkulturüberstand z.B. der B95-8 Zelllinie inkubiert. Diese Affenzelllinie gibt infektiöses EBV in den Zellkulturüberstand ab, wodurch die B-Zellen des Spenders infiziert und immortalisiert werden.

Zur Offenbarung wird beispielsweise auf die nachfolgenden Veröffentlichungen hingewiesen: v. Knebel Doeberitz et al., 1983; Rickinson et al., 1984.

Durch die Infektion der immortalisierten autologen B-Zellen kommt es zu einer Expression der aus der Ursprungszelle stammenden pseudoviralen Gensegmente, die ähnlich wie die genetische Information der viruseigenen Negativ-Strang RNAs als Proteine exprimiert werden. Spaltprodukte dieser Proteine werden durch die zelleigene Antigen-Präsentationsmaschinerie in Verbindung mit MHC Molekülen auf der Zelloberfläche der B-Zellen präsentiert, wo sie von Antigen-spezifischen T-Zellen erkannt werden können.

Bei der vorliegenden Erfindung werden somit zum Zwecke der Antigen-Identifikation Gemische von unbekannten cDNAs in die immortalisierten autologen Zellen, die zur Antigenpräsentation befähigt sind (APC= antigen presenting cells) transient eingebracht. Eine stabile Transfektion der APCs mit den cDNAs verbietet sich für das erfindungsgemäße Verfahren aus zwei Gründen. Erstens bedingt die stabile Transfektion mit Hilfe von Resistenzgenen immer eine Selektion auf wachstumsfördernde und gegen wachstumshemmende Gene. Dies führt durch die selektionsbedingte lange Kulturdauer der Zellen zu einer Verschiebung in der Repräsentanz der cDNA Bank. Zweitens führt die Expression von toxischen, z.B. Apoptose-fördernden Genen zum Absterben der transfizierten Zellen und somit zum Verlust dieser Gene. Um diese Selektionsmechanismen, die eine Identifizierung potentieller Antigene verhindern würden, zu vermeiden, müssen kürzestmögliche Versuchsbedingungen angestrebt werden. Nach transienter Transfektion von Zellen mit Plasmiden wird das maximale Expressionsniveau nach 48-72 Stunden erreicht. In dieser Hinsicht ist z.B. das Influenza System der normalerweise üblichen transienten Transfektion mit Plasmiden überlegen. Bedingt durch die viruseigene Transkriptionsmaschinerie kommt es bereits 6 – 12 Stunden nach Infektion zu einer maximalen Expression des eingebrachten Fremdgens. Dadurch verkürzen sich die Versuchszeiten nach Einbringen des Fremdgens von etwa 72 Stunden auf nur 24 Stunden.

In einem nächsten Schritt werden deshalb die mit rekombinanten Influenza-Viren infizierten B-Zellen mit autologen T-Zell-Klonen co-kultiviert, die eine Spezifität für das zu identifizierende Antigen besitzen. Wurde durch die Influenza-Viren eine cDNA als vRNA in die B-Zellen eingeschleust und exprimiert, welche für das von den T-Zellen erkannte Antigen kodiert, kommt es zu einer Stimulation der Antigen-spezifischen T-Zellen. Mit der Stimulation der T-Zellen über ihren T-Zellrezeptor ist eine Freisetzung von Zytokinen verbunden, die mit bekannten Methoden, z. B. durch ELISA-Verfahren, nachweisbar ist. Selbstverständlich sind auch andere Verfahren einsetzbar, mit denen die Antigen-spezifische T Zell-Stimulation detektierbar ist. Hierzu gehören ausser dem Nachweis einer Zytokinexpression auch der Nachweis einer T-Zell vermittelten Zytotoxizität und andere meßbare Parameter der T-Zellaktivierung.

Waren innerhalb der Influenza-Viruspopulation Viruspartikel enthalten, die für das betreffende Antigen kodieren und T-Zellen zur Zytokinfreisetzung gebracht haben, wird die Viruspopulation in kleinere Pools aufgeteilt und mit diesen die Infektion der B-Zellen und die Prozedur der Antigenerkennung wiederholt. Nach Vereinzelung der Viren, die für das Antigen kodieren, kann in einem folgenden Schritt die Isolierung und Identifizierung des von den T-Zellen erkannten Antigens erfolgen.

Als Alternative für die modifizierten Influenza-Viren können auch Retroviren für die Infektion von autologen LCL und zur Expression der zu identifizierenden Antigene eingesetzt werden. Mit Retroviren ist eine ähnlich gute Transduktionseffizienz wie mit modifizierten Influenza Viren zu erreichen, Retroviren erreichen jedoch nicht das hohe Expressionsniveau der modifizierten Influenza Viren. Die Herstellung rekombinanter Retroviren ist im Stand der Technik ausführlich beschrieben und nur beispielhaft wird hier auf die Veröffentlichung von Kinsella et al. (1996) verwiesen.

Im folgenden ist die Beschreibung von zwei Versuchen dargestellt, so wie sie im Labor, einmal mit modifizierten Influenza Viren „1104“ und einmal mit Retroviren, durchgeführt wurden.

#### Herstellung rekombinanter Influenza Viren, Infektion autologer LCL und Erkennung eines Modellantigens

Der offene Leserahmen des Neomycin-Phosphotransferase II Gens wurde in die Polylinker-Sequenz des oben beschriebenen Influenza-Vektor-Plasmids in inverser Orientierung bezüglich des Polymerase I Promotors inkloniert, und E. coli damit transformiert. Für die Erkennung des Neomycin-Phosphotransferase II Genprodukts stehen im Labor Antigen-spezifische T-Zellen zur Verfügung. Nach präparativer Plasmidaufarbeitung mit Hilfe kommerziell vertriebener Verfahren (Qiagen Maxi Prep Kit) wurden 5µg Plasmid DNA mit 185µl Medium und 15µl Lipofectamine TM (Gibco BRL) gemischt und für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe weiterer 3 ml Medium wurde das Gemisch auf  $2,5 \times 10^6$  293T Zellen gegeben. Nach 6 Stunden wurde der Überstand abgenommen und durch

Zellmedium ersetzt. 18 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen gewaschen und mit Influenza A Virus überinfiziert ( $\text{MOI} = 1$ ), und weitere 15 Stunden später rekombinantes Virus im Zellüberstand geerntet. Zur Erhöhung des Virustiters wurden  $1 \times 10^7$  MDCK Zellen mit 1 ml Virusüberstand inkubiert. Mit  $10 \mu\text{l}$  des wiederum nach 15 Stunden geernteten Kulturüberstandes wurden  $1 \times 10^5$  LCL infiziert und anschließend mit der gleichen Zahl Antigen-spezifischer T-Zellen co-kultiviert. Nach 20 Stunden wurde die GM-CSF Konzentration im Kulturüberstand mit Hilfe eines ELISAs ermittelt.

Herstellung von rekombinanten Retroviren, Infektion von autologen LCL und Erkennung eines Modellantigens durch Antigen-spezifische T-Zellen

Als Modellantigen für die MHC Klasse II restringierte T Zell Erkennung nach retroviraler Transduktion wurde wiederum das Neomycin-Phosphotransferase II Gen, und für die Bestimmung der Infektionseffizienz, das green fluorescence protein (GFP) verwendet. Die offenen Leserahmen beider Gene wurden zwischen die 5' und 3' retroviralen Long Terminal Repeats (LTR) von Moloney murine leukemia virus (M-MuLV) in dem Plasmid PINCO (Grignani et al., 1998) einkloniert, und wie oben beschrieben in E.coli amplifiziert. Um rekombinante Retroviren herzustellen, wurden  $5 \mu\text{g}$  Plasmid DNA mit  $370 \mu\text{l}$  Medium (ohne FCS) und  $30 \mu\text{l}$  Lipofectamine<sup>TM</sup> (Gibco BRL) gemischt und 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe weiterer 3ml Medium wurde das Gemisch auf  $2 \times 10^6$  Zellen der amphotropen Verpackungszelllinie Phoenix gegeben und für 6 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. 24 Stunden nach Transfektion wurden  $2 \mu\text{g}$  Puromycin / ml Kulturmedium zugegeben, wodurch nur Zellen überleben, die den PINCO Vektor aufgenommen haben. Nach 48 stündiger Puromycin Selektion wurden die Zellen gewaschen und in Medium ohne Puromycin aufgenommen. Der virushaltige Kulturüberstand wurde nach 48-72 Stunden geerntet, der Virustiter lag bei  $2 \times 10^6$  Viren pro ml Kulturmedium.

Zur Infektion von LCL wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in 2ml Virusüberstand aufgenommen und Polybrene in einer Konzentration von  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen bei 1800 rpm in einer Varifuge 3.2RS (Heraeus) für 30 Min. bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Zugabe von neuem Virusüberstand und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen für

12h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Virusüberstand durch Kulturmedium ersetzt. 48 Stunden nach Infektion wurden  $1 \times 10^5$  infizierte LCL mit der gleichen Anzahl an Antigen-spezifischen T-Zellen co-kultiviert. Nach 20 Stunden wurde die GM-CSF Konzentration im Kulturüberstand mit Hilfe eines ELISAs ermittelt.

### Literatur

- Boon, T. (1993). Tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes; present perspectives for specific immunotherapy. *Int. J. Cancer* 54; 177-180.
- Cox, A.L., Skipper, J., Chen, Y., Henderson, R.A., Darrow, T.L., Shabanowitz, J., Engelhard, V. H., Hunt, D.F., and Slingluff, C.L. (1994). Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytolytic T cell lines. *Science* 264; 716 – 719.
- Flick, R. and Hobom, G. (1999). Interaction of influenza virus polymerase with viral RNA in the 'corkscrew' confirmation. *J. Gen. Virol.* 80, 2565-2572.
- Grignani, F., Kinsella, T., Mencarelli, A., Valtieri, M., Riganelli, D., Grignani, F., Lanfranccone, L., Peschle, C., Nolan, G. P., and Pelicci, P. G. (1998). High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Research* 58; 14-19.
- Kinsella, T.M. and Nolan, G.P. (1996). Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Human Gene Therapy* 7, 1405-1413.
- v. Knebel Doeberitz, M., Bornkamm, G. W., and zur Hausen, H. (1983). Establishment of spontaneously outgrowing lymphoblastoid cell lines with cyclosporin A. *Med. Microbiol. Immunol.* 172; 87-99.
- Miletic, H., Bruns, M., Tsiakas, K., Vogt, B., Rezai, R., Baum, c., Kühlke, K., Cosset, F.-L., Ostertag, W., Lothar, H., and von Laer, D. (1999). Retroviral vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* 73, 6114-6116.
- Neumann, G. and Hobom, G. (1995). Mutational analysis of Influenza virus promoter elements in vivo. *J. Gen. Virol.* 76, 1709-1717.



Rickinson, A. B., Rowe, M., Hart, I. J., Yao, Q. Y., Henderson, L. E., Rabin, H., and Epstein, M. A. (1984). T-cell mediated regression of 'spontaneous' and of Epstein-Barr Virus-induced B-cell transformation in vitro: studies with cyclosporin A. *Cellular Immunology* 87, 646-658.

Rosenberg, S.A. (1996). Development of cancer immunotherapies based on identification of genes encoding cancer regression antigens. *J. Natl. Cancer Inst.* 88; 1635-1644.

Rosenberg, S. A. (1999). A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 10; 281-287.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Wang, R.F., Wang, X., Johnston, S.L., Zeng, G., Robbins, P.F., and Rosenberg, S.A. (1998). Development of a retrovirus-based complementary DNA expression system for the cloning of tumor antigens. *Cancer Res.* 58; 3519-3525.

## PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Identifizierung von MHC-restringierten Antigenen mit den nachfolgenden Schritten:
  - (a) Herstellen einer Genbank oder cDNA-Bank aus einer zu untersuchenden Zelle oder einem zu untersuchenden Mikroorganismus;
  - (b) Einbringen der cDNA oder DNA der Genbank in das Genom von Retroviren oder als zusätzliche vRNA von modifizierten Influenzaviren, die eine erhöhte Transkriptions-, Replikations- und/oder Expressionsrate relativ zu dem Wildtyp aufweisen, um rekombinante Viruspartikel zu erhalten;
  - (c) Infizieren von immortalisierten autologen Zellen, die MHC Klasse I- und/oder MHC Klasse II-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, mit den in Schritt (b) erhaltenen rekombinanten Viruspartikeln;
  - (d) Exprimieren von durch die cDNA oder die DNA der Genbank kodierten Proteinen in den autologen Zellen und Präsentieren der von der autologen Zelle erzeugten Spaltprodukte dieser Proteine auf der Zelloberfläche in Verbindung mit MHC Molekülen;
  - (e) Co-Kultivieren von T-Zellen mit den autologen Zellen;

(f) Stimulieren der T-Zellen durch solche autologen Zellen, die ein durch die T-Zellen erkanntes Antigen auf ihrer Zelloberfläche präsentieren;

(g) Vereinzelung der Klone, die das Antigen exprimieren, und Identifizierung des Antigens.

2. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
als Zelle eine tierische oder humane Eukaryontenzelle ausgewählt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
als Eukaryontenzelle eine Tumorzelle oder eine durch einen Mikroorganismus infizierte Zelle eingesetzt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
eine durch ein Virus oder ein Bakterium oder einen Pilz oder eine Protozoe oder aus einer Kombination eines oder mehrerer dieser Mikroorganismen infizierte Zelle eingesetzt wird.

5. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
von der cDNA oder der DNA der Genbank abgeleitete Negativstrang RNAs in ein oder mehrere Segmente der modifizierten Influenzaviren und/oder als zusätzliches Segment in die modifizierte Influenzaviren eingebracht werden.

6. Verfahren nach Anspruch 5,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
als modifizierte Influenzaviren modifizierte Influenza-A-Viren und als Retroviren amphotrope oder pseudotypisierte Retroviren sowie Lentiviren eingesetzt werden.

7. Verfahren nach Anspruch 5,  
dadurch gekennzeichnet, daß

die Herstellung der Negativstrang-RNA durch Transkription der pseudoviralen Gensegmente mit der RNA-Polymerase I erfolgt.

8. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß  
nach Schritt (b) durch Selektion eine Anreicherung der rekombinanten Viruspartikel erfolgt und/oder die rekombinanten Viruspartikel isoliert werden.
9. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß  
die Spaltprodukte der Proteine in Verbindung mit MHC Klasse I oder MHC Klasse II auf der B-Zelle präsentiert werden.
10. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß  
die Stimulation der antigenspezifischen T-Zellen durch Freisetzung von Zytokinen, durch Proliferation der T-Zellen oder durch Nachweis der zytotoxischen Aktivität der T-Zellen gemessen wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß  
die Freisetzung der Zytokine durch ein ELISA Verfahren nachgewiesen wird.
12. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß  
nach Einbringen der cDNA oder der DNA der Genbank eine Überinfektion mit Wildtyp Influenza-Virus erfolgt.
13. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß

die Immortalisierung der autologen Zellen mit Hilfe von EBV-Genen oder Onkogenen erfolgt.

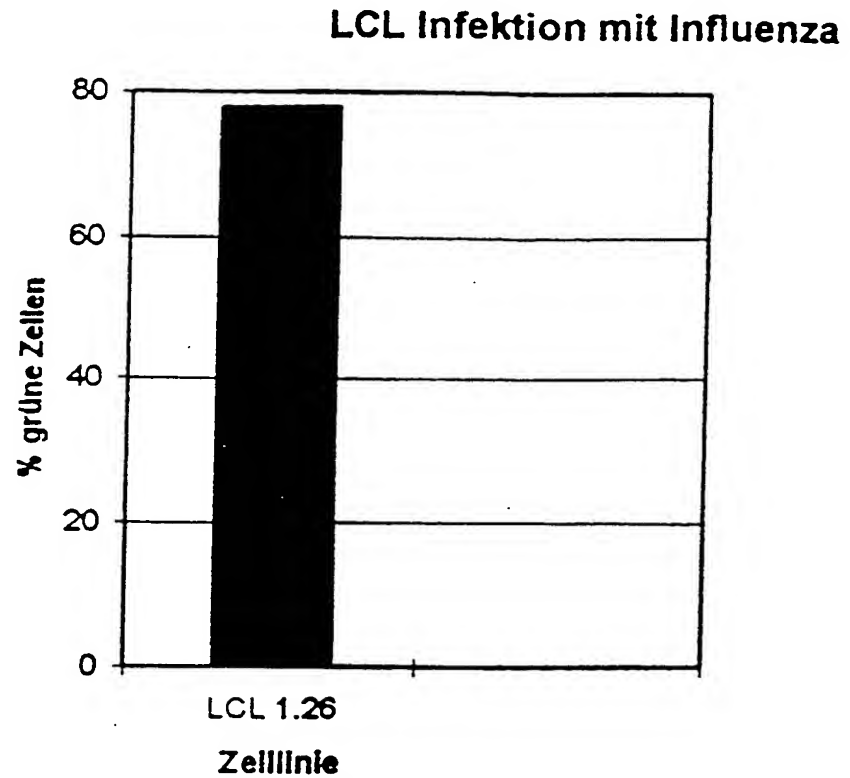
14. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Co-Kultivierung der B Zellen mit T Helferzellen bei MHC Klasse II restringierten Antigenen und mit zytotoxischen T Zellen bei MHC Klasse I restringierten Antigenen erfolgt.

15. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Genbank oder cDNA-Bank aus einem Virus, einem Bakterium, einem Pilz oder einem Protozoen hergestellt wird.

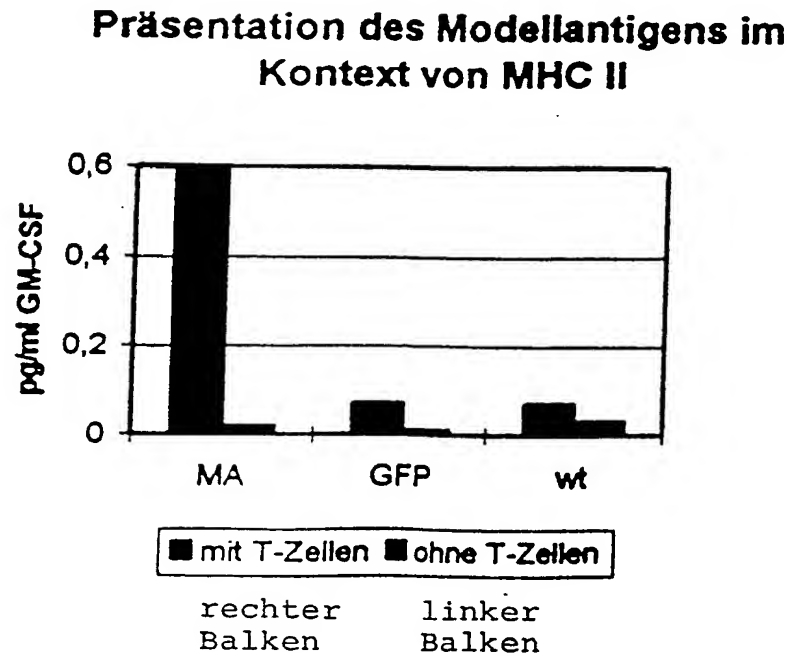
16. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als autologe Zellen B Zellen oder dendritische Zellen eingesetzt werden.



Figur 1



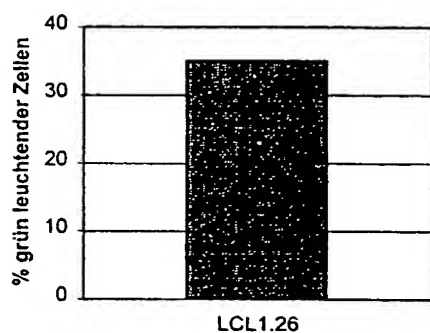
Figur 2



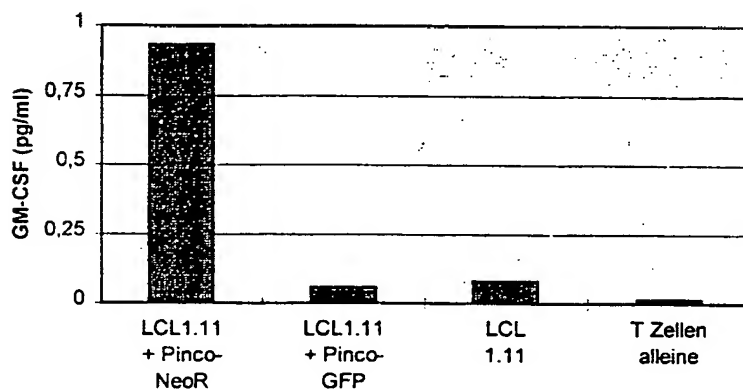




Figur 3:

**LCL Infektion mit Retroviren**

Figur 4:

**Präsentation des Modellantigens im Kontext von MHC Klasse II Molekülen nach Infektion mit Rekombinanten Retroviren.**



## VERFAHREN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON MHC-RESTRINGIERTEN ANTIGENEN

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung von MHC-restringierten T-Zell-Antigenen.

Zwei Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung bilden die konzeptionelle Basis der gegenwärtigen Tumorimmunologie: 1. Die Tumorentstehung ist Folge genetischer Veränderungen der Zelle, die zur Expression aberranter Genprodukte führen. 2. T-Zellen sind in der Lage, solche Veränderungen im Proteinmuster entarteter Zellen zu erkennen. Voraussetzung für die Induktion einer antitumoralen Immunantwort ist die Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen. Die molekulare Identifizierung von T-Zell-Tumorantigenen schafft demnach die Voraussetzung für die Entwicklung Antigen-spezifischer Vakzinen sowie anderer Formen T-Zell-vermittelter Immuntherapien (Rosenberg, 1996, 1999).

In den letzten Jahren wurden insbesondere beim malignen Melanom mehrere Antigene identifiziert, die von autologen T-Zellen der Patienten erkannt werden. Ein möglicher therapeutischer Nutzen dieser Antigene wird momentan im Rahmen klinischer Studien untersucht. Für eine breite klinische Anwendung ist es allerdings notwendig, möglichst viele Tumorantigene zu identifizieren, denn: 1. Die bisher bekannten Antigene werden in der Regel nur in einem kleinen Prozentsatz aller malignen Melanome exprimiert und sind somit nur bei einem kleinen Patientenkollektiv anwendbar. 2. Da Antigene als Peptide von HLA-Molekülen

präsentiert werden und HLA-Moleküle in der menschlichen Population hochpolymorph sind, muß man möglichst viele Antigene identifizieren, um für jede HLA-Konstellation Antigene zur Vakzinierung zur Verfügung zu haben. 3. Vakzinierungen mit nur einem Antigen führen häufig zur Abschaltung dieses Antigens durch den Tumor und damit zur Resistenzentwicklung. Solcher Resistenzentwicklung soll durch eine gleichzeitige Vakzinierung mit möglichst vielen Antigenen vorgebeugt werden. Die Identifizierung weiterer Tumorantigene beim Melanom als auch bei anderen Tumoren ist somit zwingende Voraussetzung für erfolgreiche Immuntherapien.

Experimentell setzt sich die Identifizierung von Tumorantigenen aus zwei Teilschritten zusammen. Erstens, der Isolierung Tumor-spezifischer T-Zellen des Patienten durch wiederholte in vitro Stimulation mit autologen Tumorzellen, und zweitens, der molekularen Identifikation der von den T-Zellen erkannten Antigene. Hierfür ist ein einfaches und allgemein anwendbares Verfahren wünschenswert.

Aus dem Stand der Technik sind bereits einige Methoden zur Identifizierung von MHC-restringierten T-Zell Antigenen bekannt. Die bekannten Lösungsansätze umfassen insbesondere die folgenden Verfahren (Rosenberg, 1999):

Transiente Transfektion von allogenen oder xenogenen Zelllinien;  
Elution und HPLC Fraktionierung MHC gebundener Peptide;  
Retrovirale Transduktion von autologen Fibroblasten.

Diese Methoden und die damit verbundenen Nachteile werden nachfolgend näher dargestellt.

#### 1. Transiente Transfektion von allogenen/xenogenen Zelllinien

Diese Methode beruht auf der Expression von cDNA Banken aus Tumoren in etablierten Zelllinien (Boon, 1993). Als Zielzellen werden hierfür 293 oder COS-7 Zellen verwendet, die sich sehr effizient transfizieren lassen. Bezogen auf den HLA Genotyp des jeweiligen Patienten handelt es sich dabei allerdings um allogene (293) bzw. xenogene (COS-7) Zelllinien. Da T-Zellen MHC-restringent sind, d.h. Antigen nur in Verbindung mit einem entsprechenden MHC-Molekül erkennen, ist die Kenntnis der Restriktionselemente

notwendige Voraussetzung für eine Identifizierung von Antigenen. Eine T-Zell Erkennung der eingebrachten Antigene wird nur über die Co-Transfektion des jeweiligen Restriktionselements ermöglicht. Die Identifizierung des jeweiligen Restriktionselements ist aber oftmals schwierig oder gar unmöglich. Da die verwendeten Zielzellen darüber hinaus MHC Klasse II negativ sind, ist diese Methode auf die Identifizierung von MHC Klasse I-restringierten Antigenen mit bekanntem Restriktionselement beschränkt.

## 2. Biochemische Identifikation des Antigens

Neben der Expressionsklonierung ist eine Identifikation von MHC Klasse I-restringierten Tumorantigenen auch auf biochemischem Wege möglich (Cox et al., 1994). Dazu werden Tumorzellen lysiert und die restringierenden MHC Moleküle mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern immunpräzipitiert. Aus diesen MHC Molekülen werden die daran gebundenen Peptide eluiert und über reverse phase HPLC aufgetrennt. Anschließend werden Zielzellen mit den einzelnen Peptid-Fractionen beladen. Diese Zielzellen zeichnen sich dadurch aus, daß sie nur das jeweilige Restriktionselement in Peptid-ungebundener Form exprimieren. Die exogene Zugabe von Peptiden führt deshalb rasch zu einer Bindung durch die "leeren" MHC Moleküle. Durch Co-Kultivierung dieser Peptid-beladenen Zielzellen mit tumorspezifischen T-Zellen werden positive Fractionen identifiziert und über die Peptid-Sequenz das Antigen ermittelt. Wie bereits unter 1, so ist auch hier die Kenntnis des HLA-Restriktionselements unabdingbare Voraussetzung für die Identifizierung von T-Zell-Antigenen, und zwar erstens für die Immunpräzipitation der restringierenden MHC Moleküle und zweitens für die Beladung entsprechender Zielzellen mit den eluierten Peptiden. Ein zusätzlicher Nachteil liegt in der enorm großen Tumormenge, die für die Peptid-Gewinnung benötigt wird, so daß diese Methode nur bei Tumoren angewendet werden kann, die sich gut in vitro kultivieren und expandieren lassen. Eine Identifizierung von T-Zell-Antigenen ist auch bei dieser Methode auf MHC Klasse I-restringierte Antigene beschränkt, da eine analoge HPLC Fractionierung von MHC Klasse II-Peptiden durch deren Längen-Heterogenität unmöglich ist.

## 3. Retrovirale Transduktion autologer Fibroblasten

Das oben beschriebene Problem der notwendigen Identifikation des Restriktionselements

wird hinfällig, wenn autologe Zielzellen für die Expression der cDNA Bank aus dem Tumor verwendet werden. Für die Durchführung eines Antigen-Screenings werden große Zellmengen benötigt, so daß als Zielzellen nur solche Zellen des Patienten in Frage kommen, die sich in vitro entsprechend expandieren lassen. Fibroblasten lassen sich aus kleinen Hautbiopsien gewinnen und zudem sehr gut retroviral transduzieren. Die Identifikation von MHC Klasse I-restringierten Antigenen durch die retrovirale Transduktion autologer Fibroblasten mit cDNAs aus Tumoren wurde deshalb als Methode vorgestellt, welche die Definition des Restriktionselements überflüssig machen soll (Wang et al., 1998). Diese Methode ist allerdings mit einigen Nachteilen behaftet. Primäre Fibroblasten können nur eine begrenzte Anzahl an Passagen in vitro kultiviert werden. Da Fibroblasten außerdem kein MHC Klasse II exprimieren, ist auch diese Methode auf die Identifizierung von MHC Klasse I-restringierten Antigenen beschränkt. Im Vergleich zur transienten Expressionsklonierung, wie unter 1 beschrieben, ist die retrovirale Transduktion der Zielzellen mit einem wesentlich größeren Arbeitsaufwand verbunden. Der Hauptnachteil dieser Methode ist allerdings in der vergleichsweise niedrigen Expression der retroviral eingebrachten Gene zu sehen. Dieses niedrige Expressionsniveau bedingt eine im Vergleich zur transienten Transfektion etwa 10-fach geringere Sensitivität und somit einen 10-fach höheren Screening-Aufwand.

Es ist eine Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren bereitzustellen, das die oben beschriebenen Nachteile des Standes der Technik vermeidet, insbesondere eine Kenntnis des restringierenden MHC Moleküls nicht erfordert, eine unbegrenzte Proliferation der Zielzellen erlaubt und gleichzeitig eine Identifizierung sowohl von MHC Klasse I- als auch MHC Klasse II-restringierten Antigenen ermöglicht.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das Verfahren nach Anspruch 1 gelöst. Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen, der nachfolgenden Beschreibung sowie den Ausführungsbeispielen und Abbildungen. Die Abbildungen zeigen:

Figur 1: LCL Infektion mit Influenza

Zur Bestimmung der Influenza Infektionsrate von LCL wurde die Zelllinie LCL1.26 mit rekombinanten Influenza-Viren (FPV-1104 als Vektor) inkubiert, welche das Gen für das Green Fluorescence Protein unter der Kontrolle eines Promotors tragen, der sich durch eine verstärkte Aktivität gegenüber dem Wildtyp-Promotor auszeichnet (Promotor-Up-Variante). Nach 24 Stunden wurden die unter UV-Licht grün leuchtenden Zellen gezählt.

Figur 2: Präsentation des Modellantigens im Kontext von MHC Klasse II Molekülen nach Infektion mit rekombinanten Influenza-Virus. LCL 1.11 wurden mit Wildtyp (wt) bzw. rekombinanten FPV-Influenza Viren, die das Modellantigen unter der Kontrolle der Promotor-Up-Variante exprimieren, infiziert. Nach viraler Transduktion des Modellantigens (MA) in LCL 1.11 kommt es zu einer GM-CSF Freisetzung durch den Modellantigen--spezifischen T-Zell-Klon, nicht aber nach Wildtyp Virus (wt) Infektion oder nach Infektion mit GFP-Gen-tragenden Influenza Viren.

Figur 3: LCL Infektion mit Retroviren

$1 \times 10^5$  Zellen der EBV immortalisierten lymphoblastoiden Zelllinie LCL 1.26 wurden mit rekombinanten Retroviren infiziert, welche das green fluorescence protein exprimieren. 72 Stunden nach Infektion wurden die grün leuchtenden Zellen gezählt.

Figur 4: Präsentation des Modellantigens im Kontext von MHC Klasse II Molekülen nach Infektion mit rekombinanten Retroviren.

$1 \times 10^5$  Zellen der lymphoblastoiden Zelllinie LCL1.11 wurden retroviral mit dem Neomycin Posphotransferase II Gen (Pinco-NeoR) bzw. mit dem Green Fluorescence Protein Gen (Pinco-GFP, Grignani et al., 1998) transduziert. 72 Stunden später wurden die infizierten bzw. nicht-infizierte LCL1.11 Zellen mit  $1 \times 10^5$  T-Zellen inkubiert. Die verwendeten, MHC Klasse II restringierten T-Zellen sind spezifisch für ein auf HLA-DP3 präsentiertes Epitop des Neomycin Phosphotransferase II Proteins. Nach 24 stündiger Co-Kultivierung der Zellen wurde die GM-CSF Konzentration im Zellüberstand mittels eines ELISAs ermittelt.

Die vorliegende Erfindung schafft somit ein Verfahren zur Identifizierung von MHC-restringierten Antigenen, und zwar sowohl von MHC Klasse I und/oder Klasse II restringierten Antigenen. Die nachfolgenden Schritte werden dabei vom erfindungsgemäßen Verfahren mitumfaßt:

- (a) Herstellen einer Genbank oder cDNA-Bank aus einer zu untersuchenden Zelle oder einem zu untersuchenden Mikroorganismus;
- (b) Einbringen der cDNA oder DNA der Genbank in das Genom von Retroviren oder als zusätzliche vRNA von modifizierten Influenzaviren, die eine erhöhte Transkriptions-, Replikations- und/oder Expressionsrate relativ zu dem Wildtyp aufweisen, um rekombinante Viruspartikel zu erhalten;
- (c) Infizieren von immortalisierten autologen Zellen, die MHC Klasse I- und/oder MHC Klasse II-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, mit den in Schritt (b) erhaltenen rekombinanten Viruspartikeln;
- (d) Exprimieren von durch die cDNA oder die DNA der Genbank kodierten Proteinen in den autologen Zellen und Präsentieren der von der autologen Zelle erzeugten Spaltprodukte dieser Proteine auf der Zelloberfläche in Verbindung mit MHC Molekülen;
- (e) Co-Kultivieren von T-Zellen mit den autologen Zellen;
- (f) Stimulieren der T-Zellen durch solche autologen Zellen, die ein durch die T-Zellen erkanntes Antigen auf ihrer Zelloberfläche präsentieren;
- (g) Vereinzelung der Klone, die das Antigen exprimieren, und Identifizierung des Antigens.

Die Erfindung geht davon aus, daß aus einer Zelle, beispielsweise einer tierischen oder menschlichen Tumor-Zelle, deren mRNAs isoliert und daraus eine cDNA-Bank angelegt wird. Analog kann es sich auch um Zellen handeln, die mit einem Mikroorganismus infiziert



sind, beispielsweise einem Bakterium, einem Virus, einem Pilz oder einer Protozoe.

Selbstverständlich sind auch mischinfizierte Zellen möglich. Alternativ zu der Herstellung einer cDNA-Bank aus der infizierten Zelle kann hier auch von einer Genbank ausgegangen werden, die direkt aus dem zu untersuchenden Mikroorganismus hergestellt würde.

In einem nächsten Schritt wird die cDNA oder die DNA der Genbank in das Genom von Retroviren oder als zusätzliche vRNA in modifizierte Influenza-Viren eingebracht, wodurch rekombinante Retroviren bzw. Influenza-Viren entstehen. Als Retroviren werden bevorzugt amphotrope oder pseudotypisierte Retroviren eingesetzt. Die Herstellung rekombinanter Retroviren sowie Beispiele für amphotrope Retroviren sind in Kinsella et al. (1996), Beispiele für pseudotypisierte Retroviren in Miletic et al. (1999) beschrieben. Als weiteres Beispiel für Retroviren sei die Gruppe der Lentiviren genannt, wobei hier insbesondere HIV und SIV erwähnt werden sollen.

Als modifizierte Influenza-Viren werden bevorzugt Promotor-Up-Varianten von FPV Bratislava eingesetzt. Die Herstellung solcher Influenza-Viren mit Promotor-Up-Varianten ist in Neumann und Hobom (1995), Flick und Hobom (1999) sowie WO-A-96/10641 beschrieben.

Die genannten Influenza-Promotor-Up-Varianten weisen eine erhöhte Transkriptionsrate (sowohl mit dem vRNA Promoter als auch in dem cRNA Promoter der komplementären Sequenz) sowie eine erhöhte Replikations- und/oder Expressionsrate relativ zum Wildtyp auf und unterscheiden sich von dem Wildtyp dadurch, daß sie wenigstens ein Segment (eines der natürlich vorhandenen oder ein zusätzliches) aufweisen, in dem in den 5' und 3' konservierten Region des Wildtyps insgesamt bis zu 5 Nukleotide ausgetauscht sind. Vorzugsweise sind in der 12 Nukleotide langen 3' konservierten Region des Wildtyps die Nukleotide in Position 3 und 8 (von 3' Terminus gezählt) durch andere Nukleotide ersetzt, wobei die nun eingefügten Nukleotide ein Basenpaar bilden (Pos. 3:G, dann Pos. 8:C; Pos. 3:G, dann Pos. 8:G; usw). Darüber hinaus kann ebenfalls noch das Nukleotid in der Position 5 der 3' konservierten Region (vom 3' Terminus aus gezählt) ausgetauscht sein.

Die 3' konservierten Regionen der Wildtyp-Influenzaviren weisen die folgenden Sequenzen auf:

Influenza A: (5')-CCUGCUUUUGCU-3'

Influenza B: (5')-NN(C/U)GCUUCUGCU-3'

Influenza C: (5')-CCUGCUUCUGCU-3'

Optional können auch noch Austausche in der 13 Nukleotide langen 5' konservierten Region des Wildtyps vorgenommen werden, z. B. in Position 3 und 8, wiederum vorausgesetzt, dass die nun eingefügten Nukleotide ein Basenpaar bilden. Die 5' konservierten Regionen der Wildtyp-Influenzaviren weisen die folgenden Sequenzen auf:

Influenza A: 5'-AGUAGAAACAAGG-3'

Influenza B: 5'-AGUAG(A/U)AACA(A/G)NN-3'

Influenza C: 5'-AGCAGUAGCAAG(G/A)-3':

Bevorzugt werden in der vorliegenden Erfindung solche Influenzavirus-Mutanten verwendet, in denen in der 3' konservierten Region die Austausche G3A und C8U vorgenommen werden. Am meisten bevorzugte Influenzmutanten sind Influenza-A-Mutanten und insbesondere solche, die noch den Austausch U5C aufweisen (die vorstehenden Mutationen sind vom 3' Ende ausgehend beziffert; solches Zählen vom 3' Ende wird auch durch eine Linie auf der Zahl gekennzeichnet, so z.B. G 3A). Weitere bevorzugte Influenzmutanten umfassen die Mutationen G3C, U5C und C8G (vom 3' Ende gezählt) in der 3'-terminalen Nukleotidsequenz, was die folgende 3'-terminale Nukleotidsequenz ergibt:

(5')-CCUGGUUCUCCU-3'.

Aus den vorstehend definierten Influenzaviren sind diejenigen besonders bevorzugt, die die folgende 3'-terminale Nukleotidsequenz aufweisen:

(5')-CCUGUUUCUACU-3'

Im Falle von modifizierten Influenza-A-Viren weist das modifizierte Segment vorzugsweise noch die Modifikationen U3A und A8U in seiner 5'-terminalen Sequenz auf, im Falle von Influenza-C-Viren kann es noch die Modifikationen C3U und G8A in seiner 5'-terminalen Sequenz aufweisen.

Die am meisten bevorzugten Influenza-Promoter-Up-Varianten der vorliegenden Erfindung weisen die folgenden allgemeinen Strukturen auf:

Influenza A (Promoter-Up-Variante "1104"):

5'-AGUAGAAACAAGGNNNU<sub>5-6</sub>...(880-2300 ntd)...N'N'N'CCUGUUUCuACU-3'

Influenza A (Promoter-Up-Variante "1920"):

5'-AGAAGAAUCAAGGNNNU<sub>5-6</sub>...(880-2300 ntd)...N'N'N'CCUGUUUCuACU-3'

Influenza A (Promoter-Up-Variante "1948"):

5'-AGUAGAAACAAGGNNNU<sub>5-6</sub>...(880-2300 ntd)...N'N'N'CCUGGUUCuCCU-3'

Influenza B:

5'-AGUAG(A/U)AACA(A/G)NNNNNU<sub>5-6</sub>...(880-2300 ntd)...N'N'N'N'(C/U)GUUUCUACU-3'

Influenza C:

5'-AGUAGUAACAAG(G/A)GU<sub>5-6</sub>... (880-2300 ntd)...CCCCUGUUUCUACU-3'

In diesen Strukturen gilt:

- 1) Unterstrichen (und größer) die notwendigen Mutationen gegenüber der Wildtypsequenz zur Erzeugung der Promoter-Up-Variante;
- 2) größeres nicht unterstrichen A in dem 5' Teil der Sequenz: überzähliges A (Position 10), winkelförmig;
- 3) (A/G) an einer Position: unterschiedliche Isolate bzw. Einzelsegmente mit verschiedener Sequenz jeweils an Positionen, die analytisch austauschbar sind;

- 4) N und N': unbestimmte, aber basengepaarte Positionen, komplementär zwischen 5' und 3' Ende, für verschiedene der acht Segmente unterschiedlich, jedoch jeweils konstant über alle Isolate;
- 5) (880-2300 ntd): die Segmentlänge der Virussegmente, bei Segmenten mit Fremdgen-Inhalt bis zu 4000 ntd.

Die rekombinanten Viren werden auf geeigneten Wirtszellen vermehrt und gegebenenfalls durch an sich bekannte Methoden isoliert. Mit diesen rekombinanten Retroviren bzw. Influenza-Viren werden dann immortalisierte autologe Zellen, bevorzugt B-Zellen oder dendritische Zellen, die MHC Klasse I- und/oder MHC Klasse II-Moleküle exprimieren, infiziert. Hieran schließen sich die Schritte d) bis g), wie oben beschrieben, an.

Erfindungsgemäß wird unter "autolog" die Herkunft der Zellen verstanden, d.h. die Zellen stammen aus demselben Individuum wie die T-Zellen, mit denen das Screening auf Antigenexpression durchgeführt wird.

Voraussetzung für die vorliegende Erfindung ist natürlich, daß T-Zellklone eingesetzt werden, die ein Antigen in bestimmten Zellen erkennen. Da die Identität des von den T-Zellen erkannten Antigens unbekannt ist, soll herausgefunden werden, welches Antigen von den T-Zellen erkannt wird. Die Verfügbarkeit der T-Zellklone sagt somit nichts über die Natur des Antigens aus. Beispielsweise geht man von T-Zellklonen aus, die eine Prostata-Karzinomlinie erkennen, nicht aber EBV-immortalisierte Zellen sowie Fibroblasten desselben Individuums. Ziel ist es nunmehr, mit Hilfe einer cDNA-Bank aus den Prostatakarzinomzellen, den autologen EBV-immortalisierten Zellen als Empfängerzellen für die cDNA-Bank und den spezifischen T-Zellklonen das noch unbekannte Antigen zu identifizieren.

Nachfolgend wird die Erfindung im einzelnen ausgeführt.

Der Erfindung vorausgegangen war die Etablierung von tumorspezifischen T-Zell-Klonen. Da T-Zellen Antigen nur in Verbindung mit MHC Molekülen erkennen, bei einigen Klonen

eine Identifizierung des restringierenden MHC Moleküls aber nicht möglich war, konnten bereits etablierte Methoden zur Identifizierung von T-Zell-Antigenen für diese Klone nicht angewendet werden. Da Zellen unterschiedlicher Gewebe eines Individuums identische MHC Moleküle exprimieren, wurde nach Möglichkeiten gesucht, autologe B-Zellen des Patienten als Empfängerzellen für die Expression von cDNA Banken aus dem Tumor nutzbar zu machen. B-Zellen von jedem beliebigen Individuum können mit Epstein-Barr Virus, einem humanen Vertreter der Lymphocryptovirus-Gruppe oder verwandten Primaten-Viren dieser Gruppe infiziert, immortalisiert und in praktisch unbegrenzter Menge als sog. lymphoblastoide Zelllinien (LCL) verfügbar gemacht werden. Die Verwendung von autologen LCL als Zielzellen erübrigt die teilweise schwierige bis unmögliche Identifizierung der MHC Restriktionselemente. Da LCL konstitutiv MHC Klasse I und Klasse II exprimieren, ist sowohl eine Identifikation von MHC Klasse I-restringierten Antigenen, die von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden, als auch von MHC Klasse II-restringierten Antigenen, die von T-Helferzellen erkannt werden, möglich.

Die Verwendung von autologen LCL des Patienten als Zielzellen setzt allerdings einen effizienten Gentransfer in diese Zellen voraus, der bisher weder durch chemische noch physikalische Transfektionsmethoden erzielt werden konnte. Über die Infektionsrate von LCL mit Viren ist vergleichsweise wenig bekannt. Wie im folgenden beschrieben, wird durch die Verwendung von modifizierten Influenza A Viren erstens eine einzigartig effiziente Infektion von LCL erreicht, zweitens kommt es durch die Verwendung der transkriptionsaktivierten viruseigenen regulatorischen Elemente in den FPV-Virusvarianten zu einer unübertroffenen hohen Genexpression der eingebrachten Erbinformation, was eine hohe Sensitivität und somit Einfachheit des Nachweises bedingt.

Die hier beschriebene Nutzung von Influenza A Virus-abgeleiteten Vektoren für den Gentransfer in LCL setzte eine Bestimmung der Infektionseffizienz voraus. Wie in Abbildung 1 gezeigt, werden bis zu 80% der lymphoblastoiden Zelllinien LCL1.26 mit diesen Viren infiziert.

Neben einer hohen Infektionsrate mußte für die beabsichtigte Anwendung eine Reihe weiterer Voraussetzungen erfüllt sein, damit eine Nutzung des Influenza Virussystems zum genannten Zweck möglich wird.

1. Expressionsniveau des eingebrachten Fremdgenoms?

Für eine hohe Sensitivität des Nachweisverfahrens ist eine hohe Expressionsrate der in die Zellen eingebrachten Fremdsequenz essentiell. Durch die Nutzung der influenza-viralen Transkriptions/Translations-Maschinerie konnte, wie in Western Analysen für ein Modellantigen nachgewiesen, eine etwa 5-fach höhere Expressionsrate als nach transienter Transfektion und ein etwa 10-fach höheres Expressionsniveau als nach retroviraler Transduktion erzielt werden.

2. Virale Interferenz mit Antigen-Präsentation und -Erkennung?

Für mehrere Viren ist bekannt, daß sie mit der Antigenpräsentation interferieren und so einer Immunerkennung entgehen. Um für das verwendete Influenza A Virus analoge Mechanismen auszuschließen, wurde ein für ein Modellantigen kodierendes Gen in die FPV-Viren eingebracht und LCLs damit infiziert. Die MHC Präsentation des Modellantigens wurde durch einen Modellantigen-spezifischen T-Zell-Klon ermittelt. Wie in Abbildung 2 gezeigt, interferiert Influenza Virus nicht mit der Präsentation des Antigens. Darüber hinaus kommt es durch die Influenza Virus-Infektion weder zu einer unspezifischen T-Zell-Aktivierung noch zu einer Zytokinfreisetzung durch die infizierten LCL.

3. Infektion der T Zellen?

Der Nachweis einer T-Zell-Aktivierung setzt eine mindestens 20-stündige Co-Kultivierung von Zielzellen und T-Zellen voraus. Eine mögliche Infektion von T-Zellen durch die verwendeten Influenza Viren (aus dem Überstand oder freigesetzt aus LCL) und eine nach 8 Stunden einsetzende Lyse der Zellen würde den Nachweis einer spezifischen T-Zell-Aktivierung unmöglich machen. Wie ebenfalls mit Hilfe des Green Fluorescence Protein

(GFP) nachgewiesen werden konnte, infizieren die verwendeten Influenzaviren die T-Zellen nicht oder zumindest nicht produktiv, d.h. virale Gene werden nicht exprimiert.

Zur Bestimmung der Influenza-Infektionsrate von LCL wurde die Zelllinie LCL 1.26 mit rekombinanten Influenza-Viren inkubiert, welche das Gen für das Green Fluorescence Protein tragen. Nach 24 Stunden wurden die unter UV Licht grün leuchtenden Zellen gezählt.

Als mögliche Alternative zum Gentransfer durch rekombinante Influenza Viren kamen auch rekombinante Retroviren in Betracht und wurden deshalb in unsere Untersuchungen mit einbezogen. Eine sehr gute Effizienz des Gentransfers ließ sich, wie in Abbildung 3 gezeigt, auch mit rekombinanten Retroviren erreichen. Mit Hilfe von Modellantigenen konnte auch mit rekombinanten Retroviren eine Antigen-spezifische T-Zell-Stimulation nachgewiesen werden (Abbildung 4). Allerdings erreichen Retroviren nicht das hohe Expressionsniveau von Influenza Viren.

Nachfolgend wird die Erfindung allgemein dargestellt.

Ausgangspunkt des Verfahrens der Erfindung ist die Isolierung von mRNA oder von DNA aus Zellen, deren Antigene einer Untersuchung unterzogen werden sollen. Hierzu werden insbesondere Zellen humanen Ursprungs eingesetzt, wiewohl jedoch auch Zellen tierischen Ursprungs, beispielsweise aus Nagern wie Mäusen oder Ratten, verwendbar sind. Bevorzugt handelt es sich um Zellen aus einem Patienten, der an einem Tumor leidet, z. B. einem Tumor des blutbildenden Systems wie einem B Zell Tumor, z. B. einer Leukämie. Das Verfahren läßt sich jedoch auch für die Identifizierung von Autoantigenen oder von Fremdanitigen anwenden, z.B. aus mikrobiell infiziertem Gewebe (Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen sowie jede beliebige Mischinfektion). Handelt es sich dabei um einen bekannten Mikroorganismus, so kann dessen Erbinformation (in Form von RNA oder genomischer DNA) auch direkt verwendet werden.

Die Isolierung der mRNA oder der DNA erfolgt durch an sich bekannte molekularbiologische Methoden. Verwiesen sei hier beispielsweise auf Sambrook et al., (1989). Die mRNA wird anschließend durch ebenfalls bekannte Techniken in ihre cDNA umgeschrieben, um eine

cDNA-Bank der Zelle zu gewinnen. Es wird hier auf die obige, beispielhaft genannte Veröffentlichung verwiesen.

Die im Gemisch der cDNA- oder DNA-Fragmente enthaltene genetische Information wird nunmehr in das Genom von Influenza-Viren eingebracht. Die Vorgehensweise ist allgemein dargestellt wie folgt:

Die genetische Information für die von Influenza A Viren kodierten Proteine befindet sich auf 8 Negativ-Strang RNAs, wobei die kodierenden Bereiche jeweils von den Virus-spezifischen Promotor- und Terminationssequenzen flankiert werden, die sowohl die Transkription und die Replikation als auch die Verpackung der vRNAs in die Viruspartikel steuern.

Die Herstellung rekombinanter Influenza-Viren, d.h. die Verpackung eines Fremdgens in Influenza A Viruspartikel, und die Expression dieses Gens nach Infektion einer Zielzelle setzt voraus, daß dieses Gen erstens als Negativ-Strang RNA vorliegt und zweitens die viralen Promotor- bzw. Verpackungssignale trägt. Dies kann beispielsweise erreicht werden durch die Verwendung eines Plasmid-Vektors, der neben einem Resistenzgen, beispielsweise für Ampicillin, und einem bakteriellen Replikationsursprung zusätzlich eine Polylinker-Sequenz besitzt, die unmittelbar beiderseits von den nicht-translatierten (cDNA) Promotorsequenzen von Influenza A Virus flankiert wird, jedoch in modifizierter Form, die zur Aktivitätssteigerung des Promotors führt. Die viralen 5' und 3' Promotorsequenzen sind ihrerseits von den Sequenzen des humanen RNA Polymerase I Promotors und Terminators umgeben, die aus der humanen rDNA isoliert wurden.

Zur Erstellung einer cDNA Bank werden die cDNAs aus dem zu untersuchenden Gewebe in die Polylinker-Sequenz dieses Plasmids in inverser Orientierung bezüglich des RNA Polymerase I Promotors kloniert und in E.coli amplifiziert. Nach transienter Transfektion dieser Plasmide in geeignete Zielzellen entstehen durch die transkriptionelle Aktivität von RNA Polymerase I aus den einklonierten cDNAs pseudovirale negativ-Strang RNAs, die an ihren Enden die viralen Transkriptions- und Verpackungssignale tragen. Da die Verpackung der viralen RNAs in Viruspartikel nicht von der kodierenden Region, sondern ausschließlich



von den regulatorischen Signalsequenzen am 5'- und 3'-Ende abhängt, werden diese pseudoviralen RNAs nach Überinfektion der transfizierten Zellen mit Influenza A Helfer-Virus (FPV Bratislava) in die neugebildeten Viruspartikel aufgenommen, die in den Kulturüberstand abgegeben werden. Die in den Zellkulturüberstand freigesetzten Viren werden geerntet und wahlweise weiter konzentriert. Selbstverständlich sind auch andere dem Fachmann bekannte oder von ihm im Rahmen der Versuche zu konstruierende Vektoren, die auf Influenza-Viren, aber auch auf den nachfolgend beschriebenen Retroviren beruhen, im Rahmen der Erfindung einsetzbar.

In einem nächsten Schritt werden autologe B-Zellen mit den rekombinanten Viruspartikeln, die eine oder mehrere Kopien von cDNAs als Negativ-Strang vRNAs enthalten, infiziert. Die B-Zellen müssen vor der Infektion immortalisiert werden, wobei bevorzugt EBV-Gene eingesetzt werden. Es sind aber auch andere Immortalisierungssysteme bekannt, so z. B. Onkogene. Hierbei wird wie folgt vorgegangen:

Aus dem peripheren Blut des Spenders werden Lymphozyten (PBL) über einen Ficoll-Gradienten aufgereinigt und mit EBV-haltigem Zellkulturüberstand z.B. der B95-8 Zelllinie inkubiert. Diese Affenzelllinie gibt infektiöses EBV in den Zellkulturüberstand ab, wodurch die B-Zellen des Spenders infiziert und immortalisiert werden.

Zur Offenbarung wird beispielsweise auf die nachfolgenden Veröffentlichungen hingewiesen: v. Knebel Doeberitz et al., 1983; Rickinson et al., 1984.

Durch die Infektion der immortalisierten autologen B-Zellen kommt es zu einer Expression der aus der Ursprungszelle stammenden pseudoviralen Gensegmente, die ähnlich wie die genetische Information der viruseigenen Negativ-Strang RNAs als Proteine exprimiert werden. Spaltprodukte dieser Proteine werden durch die zelleigene Antigen-Präsentationsmaschinerie in Verbindung mit MHC Molekülen auf der Zelloberfläche der B-Zellen präsentiert, wo sie von Antigen-spezifischen T-Zellen erkannt werden können.

Bei der vorliegenden Erfindung werden somit zum Zwecke der Antigen-Identifikation Gemische von unbekannten cDNAs in die immortalisierten autologen Zellen, die zur Antigenpräsentation befähigt sind (APC= antigen presenting cells) transient eingebracht. Eine stabile Transfektion der APCs mit den cDNAs verbietet sich für das erfindungsgemäße Verfahren aus zwei Gründen. Erstens bedingt die stabile Transfektion mit Hilfe von Resistenzgenen immer eine Selektion auf wachstumsfördernde und gegen wachstumshemmende Gene. Dies führt durch die selektionsbedingte lange Kulturdauer der Zellen zu einer Verschiebung in der Repräsentanz der cDNA Bank. Zweitens führt die Expression von toxischen, z.B. Apoptose-fördernden Genen zum Absterben der transfizierten Zellen und somit zum Verlust dieser Gene. Um diese Selektionsmechanismen, die eine Identifizierung potentieller Antigene verhindern würden, zu vermeiden, müssen kürzestmögliche Versuchsbedingungen angestrebt werden. Nach transienter Transfektion von Zellen mit Plasmiden wird das maximale Expressionsniveau nach 48-72 Stunden erreicht. In dieser Hinsicht ist z.B. das Influenza System der normalerweise üblichen transienten Transfektion mit Plasmiden überlegen. Bedingt durch die viruseigene Transkriptionsmaschinerie kommt es bereits 6 – 12 Stunden nach Infektion zu einer maximalen Expression des eingebrachten Fremdgens. Dadurch verkürzen sich die Versuchszeiten nach Einbringen des Fremdgens von etwa 72 Stunden auf nur 24 Stunden.

In einem nächsten Schritt werden deshalb die mit rekombinanten Influenza-Viren infizierten B-Zellen mit autologen T-Zell-Klonen co-kultiviert, die eine Spezifität für das zu identifizierende Antigen besitzen. Wurde durch die Influenza-Viren eine cDNA als vRNA in die B-Zellen eingeschleust und exprimiert, welche für das von den T-Zellen erkannte Antigen kodiert, kommt es zu einer Stimulation der Antigen-spezifischen T-Zellen. Mit der Stimulation der T-Zellen über ihren T-Zellrezeptor ist eine Freisetzung von Zytokinen verbunden, die mit bekannten Methoden, z. B. durch ELISA-Verfahren, nachweisbar ist. Selbstverständlich sind auch andere Verfahren einsetzbar, mit denen die Antigen-spezifische T Zell-Stimulation detektierbar ist. Hierzu gehören ausser dem Nachweis einer Zytokinexpression auch der Nachweis einer T-Zell vermittelten Zytotoxizität und andere meßbare Parameter der T-Zellaktivierung.

Waren innerhalb der Influenza-Viruspopulation Viruspartikel enthalten, die für das betreffende Antigen kodieren und T-Zellen zur Zytokinfreisetzung gebracht haben, wird die Viruspopulation in kleinere Pools aufgeteilt und mit diesen die Infektion der B-Zellen und die Prozedur der Antigenerkennung wiederholt. Nach Vereinzelung der Viren, die für das Antigen kodieren, kann in einem folgenden Schritt die Isolierung und Identifizierung des von den T-Zellen erkannten Antigens erfolgen.

Als Alternative für die modifizierten Influenza-Viren können auch Retroviren für die Infektion von autologen LCL und zur Expression der zu identifizierenden Antigene eingesetzt werden. Mit Retroviren ist eine ähnlich gute Transduktionseffizienz wie mit modifizierten Influenza Viren zu erreichen, Retroviren erreichen jedoch nicht das hohe Expressionsniveau der modifizierten Influenza Viren. Die Herstellung rekombinanter Retroviren ist im Stand der Technik ausführlich beschrieben und nur beispielhaft wird hier auf die Veröffentlichung von Kinsella et al. (1996) verwiesen.

Im folgenden ist die Beschreibung von zwei Versuchen dargestellt, so wie sie im Labor, einmal mit modifizierten Influenza Viren „1104“ und einmal mit Retroviren, durchgeführt wurden.

#### Herstellung rekombinanter Influenza Viren, Infektion autologer LCL und Erkennung eines Modellantigens

Der offene Leserahmen des Neomycin-Phosphotransferase II Gens wurde in die Polylinker-Sequenz des oben beschriebenen Influenza-Vektor-Plasmids in inverser Orientierung bezüglich des Polymerase I Promotors einkloniert, und E. coli damit transformiert. Für die Erkennung des Neomycin-Phosphotransferase II Genprodukts stehen im Labor Antigen-spezifische T-Zellen zur Verfügung. Nach präparativer Plasmidaufarbeitung mit Hilfe kommerziell vertriebener Verfahren (Qiagen Maxi Prep Kit) wurden 5µg Plasmid DNA mit 185µl Medium und 15µl Lipofectamine TM (Gibco BRL) gemischt und für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe weiterer 3 ml Medium wurde das Gemisch auf  $2,5 \times 10^6$  293T Zellen gegeben. Nach 6 Stunden wurde der Überstand abgenommen und durch

Zellmedium ersetzt. 18 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen gewaschen und mit Influenza A Virus überinfiziert ( $\text{MOI} = 1$ ), und weitere 15 Stunden später rekombinantes Virus im Zellüberstand geerntet. Zur Erhöhung des Virustiters wurden  $1 \times 10^7$  MDCK Zellen mit 1 ml Virusüberstand inkubiert. Mit  $10 \mu\text{l}$  des wiederum nach 15 Stunden geernteten Kulturüberstandes wurden  $1 \times 10^5$  LCL infiziert und anschließend mit der gleichen Zahl Antigen-spezifischer T-Zellen co-kultiviert. Nach 20 Stunden wurde die GM-CSF Konzentration im Kulturüberstand mit Hilfe eines ELISAs ermittelt.

Herstellung von rekombinanten Retroviren, Infektion von autologen LCL und Erkennung eines Modellantigens durch Antigen-spezifische T-Zellen

Als Modellantigen für die MHC Klasse II restringierte T Zell Erkennung nach retroviraler Transduktion wurde wiederum das Neomycin-Phosphotransferase II Gen, und für die Bestimmung der Infektionseffizienz, das green fluorescence protein (GFP) verwendet. Die offenen Leserahmen beider Gene wurden zwischen die 5' und 3' retroviralen Long Terminal Repeats (LTR) von Moloney murine leukemia virus (M-MuLV) in dem Plasmid PINCO (Grignani et al., 1998) einkloniert, und wie oben beschrieben in E.coli amplifiziert. Um rekombinante Retroviren herzustellen, wurden  $5 \mu\text{g}$  Plasmid DNA mit  $370 \mu\text{l}$  Medium (ohne FCS) und  $30 \mu\text{l}$  Lipofectamine<sup>TM</sup> (Gibco BRL) gemischt und 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe weiterer 3ml Medium wurde das Gemisch auf  $2 \times 10^6$  Zellen der amphotropen Verpackungszelllinie Phoenix gegeben und für 6 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. 24 Stunden nach Transfektion wurden  $2 \mu\text{g}$  Puromycin / ml Kulturmedium zugegeben, wodurch nur Zellen überleben, die den PINCO Vektor aufgenommen haben. Nach 48 stündiger Puromycin Selektion wurden die Zellen gewaschen und in Medium ohne Puromycin aufgenommen. Der virushaltige Kulturüberstand wurde nach 48-72 Stunden geerntet, der Virustiter lag bei  $2 \times 10^6$  Viren pro ml Kulturmedium.

Zur Infektion von LCL wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in 2ml Virusüberstand aufgenommen und Polybrene in einer Konzentration von  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen bei 1800 rpm in einer Varifuge 3.2RS (Heraeus) für 30 Min. bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Zugabe von neuem Virusüberstand und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen für

12h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Virusüberstand durch Kulturmedium ersetzt. 48 Stunden nach Infektion wurden  $1 \times 10^5$  infizierte LCL mit der gleichen Anzahl an Antigen-spezifischen T-Zellen co-kultiviert. Nach 20 Stunden wurde die GM-CSF Konzentration im Kulturüberstand mit Hilfe eines ELISAs ermittelt.

### Literatur

- Boon, T. (1993). Tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes; present perspectives for specific immunotherapy. *Int. J. Cancer* 54; 177-180.
- Cox, A.L., Skipper, J., Chen, Y., Henderson, R.A., Darrow, T.L., Shabanowitz, J., Engelhard, V. H., Hunt, D.F., and Slingluff, C.L. (1994). Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytolytic T cell lines. *Science* 264; 716 - 719.
- Flick, R. and Hobom, G. (1999). Interaction of influenza virus polymerase with viral RNA in the 'corkscrew' confirmation. *J. Gen. Virol.* 80, 2565-2572.
- Grignani, F., Kinsella, T., Mencarelli, A., Valtieri, M., Riganelli, D., Grignani, F., Lanfranccone, L., Peschle, C., Nolan, G. P., and Pelicci, P. G. (1998). High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Research* 58; 14-19.
- Kinsella, T.M. and Nolan, G.P. (1996). Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Human Gene Therapy* 7, 1405-1413.
- v. Knebel Doeberitz, M., Bornkamm, G. W., and zur Hausen, H. (1983). Establishment of spontaneously outgrowing lymphoblastoid cell lines with cyclosporin A. *Med. Microbiol. Immunol.* 172; 87-99.
- Miletic, H., Bruns, M., Tsiakas, K., Vogt, B., Rezai, R., Baum, c., Kühlke, K., Cosset, F.-L., Ostertag, W., Lothar, H., and von Laer, D. (1999). Retroviral vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* 73, 6114-6116.
- Neumann, G. and Hobom, G. (1995). Mutational analysis of Influenza virus promoter elements in vivo. *J. Gen. Virol.* 76, 1709-1717.

Rickinson, A. B., Rowe, M., Hart, I. J., Yao, Q. Y., Henderson, L. E., Rabin, H., and Epstein, M. A. (1984). T-cell mediated regression of 'spontaneous' and of Epstein-Barr Virus-induced B-cell transformation in vitro: studies with cyclosporin A. *Cellular Immunology* 87, 646-658.

Rosenberg, S.A. (1996). Development of cancer immunotherapies based on identification of genes encoding cancer regression antigens. *J. Natl. Cancer Inst.* 88; 1635-1644.

Rosenberg, S. A. (1999). A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 10; 281-287.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Wang, R.F., Wang, X., Johnston, S.L., Zeng, G., Robbins, P.F., and Rosenberg, S.A. (1998). Development of a retrovirus-based complementary DNA expression system for the cloning of tumor antigens. *Cancer Res.* 58; 3519-3525.

## PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Identifizierung von MHC-restringierten Antigenen mit den nachfolgenden Schritten:
  - (a) Herstellen einer Genbank oder cDNA-Bank aus einer zu untersuchenden Zelle oder einem zu untersuchenden Mikroorganismus;
  - (b) Einbringen der cDNA oder DNA der Genbank in das Genom von Retroviren oder als zusätzliche vRNA von modifizierten Influenzaviren, die eine erhöhte Transkriptions-, Replikations- und/oder Expressionsrate relativ zu dem Wildtyp aufweisen, um rekombinante Viruspartikel zu erhalten;
  - (c) Infizieren von immortalisierten autologen Zellen, die MHC Klasse I- und/oder MHC Klasse II-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, mit den in Schritt (b) erhaltenen rekombinanten Viruspartikeln;
  - (d) Exprimieren von durch die cDNA oder die DNA der Genbank kodierten Proteinen in den autologen Zellen und Präsentieren der von der autologen Zelle erzeugten Spaltprodukte dieser Proteine auf der Zelloberfläche in Verbindung mit MHC Molekülen;
  - (e) Co-Kultivieren von T-Zellen mit den autologen Zellen;



(f) Stimulieren der T-Zellen durch solche autologen Zellen, die ein durch die T-Zellen erkanntes Antigen auf ihrer Zelloberfläche präsentieren;

(g) Vereinzelung der Klone, die das Antigen exprimieren, und Identifizierung des Antigens.

2. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
als Zelle eine tierische oder humane Eukaryontenzelle ausgewählt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
als Eukaryontenzelle eine Tumorzelle oder eine durch einen Mikroorganismus infizierte Zelle eingesetzt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
eine durch ein Virus oder ein Bakterium oder einen Pilz oder eine Protozoe oder aus einer Kombination eines oder mehrerer dieser Mikroorganismen infizierte Zelle eingesetzt wird.

5. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
von der cDNA oder der DNA der Genbank abgeleitete Negativstrang RNAs in ein oder mehrere Segmente der modifizierten Influenzaviren und/oder als zusätzliches Segment in die modifizierte Influenzaviren eingebracht werden.

6. Verfahren nach Anspruch 5,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
als modifizierte Influenzaviren modifizierte Influenza-A-Viren und als Retroviren amphotrope oder pseudotypisierte Retroviren sowie Lentiviren eingesetzt werden.

7. Verfahren nach Anspruch 5,  
dadurch gekennzeichnet, daß

die Herstellung der Negativstrang-RNA durch Transkription der pseudoviralen Gensegmente mit der RNA-Polymerase I erfolgt.

8. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß  
nach Schritt (b) durch Selektion eine Anreicherung der rekombinanten Viruspartikel erfolgt und/oder die rekombinanten Viruspartikel isoliert werden.
9. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß  
die Spaltprodukte der Proteine in Verbindung mit MHC Klasse I oder MHC Klasse II auf der B-Zelle präsentiert werden.
10. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß  
die Stimulation der antigenspezifischen T-Zellen durch Freisetzung von Zytokinen, durch Proliferation der T-Zellen oder durch Nachweis der zytotoxischen Aktivität der T-Zellen gemessen wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß  
die Freisetzung der Zytokine durch ein ELISA Verfahren nachgewiesen wird.
12. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß  
nach Einbringen der cDNA oder der DNA der Genbank eine Überinfektion mit Wildtyp Influenza-Virus erfolgt.
13. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß

die Immortalisierung der autologen Zellen mit Hilfe von EBV-Genen oder Onkogenen erfolgt.

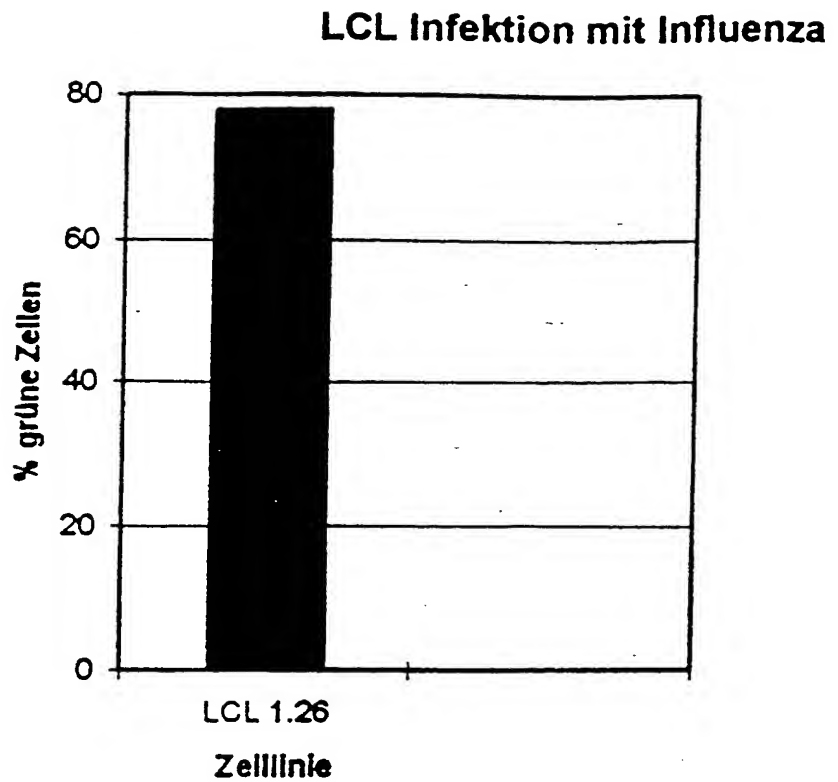
14. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Co-Kultivierung der B Zellen mit T Helferzellen bei MHC Klasse II restringierten Antigenen und mit zytotoxischen T Zellen bei MHC Klasse I restringierten Antigenen erfolgt.

15. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Genbank oder cDNA-Bank aus einem Virus, einem Bakterium, einem Pilz oder einem Protozoen hergestellt wird.

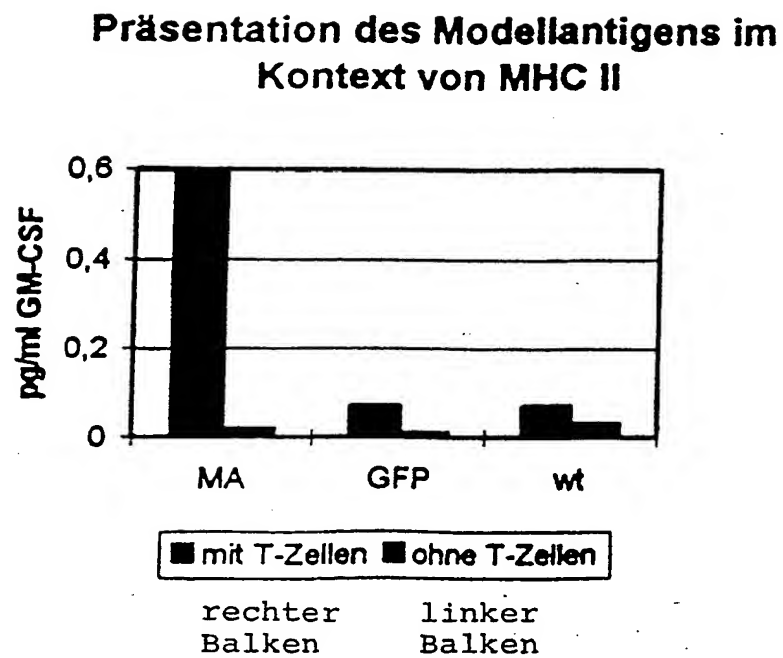
16. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als autologe Zellen B Zellen oder dendritische Zellen eingesetzt werden.



Figur 1

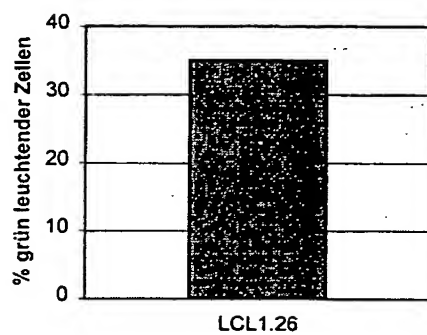


Figur 2

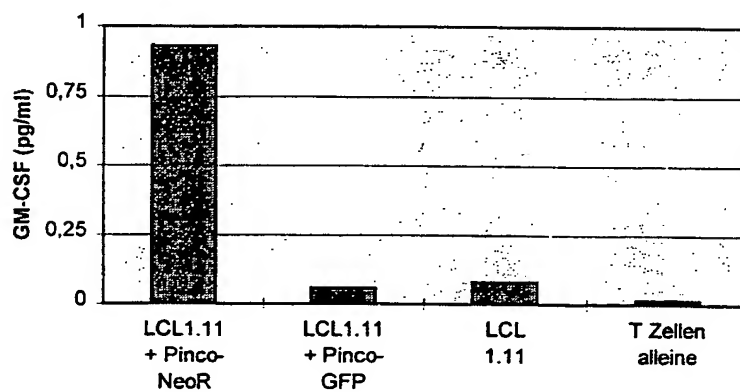




Figur 3:

**LCL Infektion mit Retroviren**

Figur 4:

**Präsentation des Modellantigens im Kontext von MHC Klasse II Molekülen nach Infektion mit Rekombinanten Retroviren.**





## SEQUENZPROTOKOLL

<110> GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit  
Artemis Pharmaceuticals GmbH

<120> Verfahren zur Identifizierung von MHC-restringierten  
Antigenen

<130> P12541

<140>  
<141>

<150> DE-199 45 171.0  
<151> 1999-09-21

<150> DE-199 51 543.3  
<151> 1999-10-26

<150> DE-199 62 508.5  
<151> 1999-12-23

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 12  
<212> RNA  
<213> Influenza A virus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(12)  
<223> 3'-konservierte Region des Wildtyp-Influenzavirus

<400> 1  
ccugcuuuug cu 12

<210> 2  
<211> 12  
<212> RNA  
<213> Influenza B virus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(12)  
<223> 3'-konservierte Region des Wildtyp-Influenzavirus

<400> 2  
nnygcuucug cu 12

<210> 3  
<211> 12  
<212> RNA  
<213> Influenza C virus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(12)  
<223> 3'-konservierte Region des Wildtyp-Influenzavirus



<400> 3  
ccugcuucug cu

12

<210> 4  
<211> 13  
<212> RNA  
<213> Influenza A virus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(13)  
<223> 5'-konservierte Region des Wildtyp-Influenzavirus

<400> 4  
aguagaaaca agg

13

<210> 5  
<211> 13  
<212> RNA  
<213> Influenza B virus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(13)  
<223> 5'-konservierte Region des Wildtyp-Influenzavirus

<400> 5  
aguagwaaca rnn

13

<210> 6  
<211> 13  
<212> RNA  
<213> Influenza C virus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(13)  
<223> 5'-konservierte Region des Wildtyp-Influenzavirus

<400> 6  
agcaguagca agr

13

<210> 7  
<211> 12  
<212> RNA  
<213> Influenza A virus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(12)  
<223> 3'-terminale Nukleotidsequenz

<400> 7  
ccugguucuc cu

12

<210> 8  
<211> 12



<212> RNA  
<213> Influenza A virus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(12)  
<223> 3'-terminale Nukleotidsequenz

<400> 8  
ccuguuucua cu

12

<210> 9  
<211> 45  
<212> RNA  
<213> Influenza A virus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (17)..(22)  
<223> Dieser U-Stretch kann 5 bis 6 U's umfassen.

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (23)..(30)  
<223> Diese Nukleotide (8 N's) dienen als Platzhalter  
für 880 bis 2300 Nukleotide ( = Segmentlänge der  
Virussegmente).

<220>  
<223> Promoter-Up-Variante 1104.

<400> 9  
aguagaaaca aggnnnuuuu uunnnnnnnnn nnnccuguuu cuacu

45

<210> 10  
<211> 45  
<212> RNA  
<213> Influenza A virus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (17)..(22)  
<223> Dieser U-Stretch kann 5 bis 6 U's umfassen.

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (23)..(30)  
<223> Diese Nukleotide dienen als Platzhalter für 880  
bis 2300 Nukleotide ( = Segmentlänge der  
Virussegmente).

<220>  
<223> Promoter-Up-Variante 1920.

<400> 10  
agaagaauca aggnnnuuuu uunnnnnnnnn nnnccuguuu cuacu

45

<210> 11  
<211> 45  
<212> RNA



<213> Influenza A virus

<220>

<221> misc\_feature

<222> (17)..(22)

<223> Dieser U-Stretch kann 5 bis 6 U's umfassen.

<220>

<221> misc\_feature

<222> (23)..(30)

<223> Diese Nukleotide (8 N's) dienen als Platzhalter für 880 bis 2300 Nukleotide ( = Segmentlänge der Virussegmente).

<220>

<223> Promoter-Up-Variante 1948.

<400> 11

aguagaaaca aggnnnuuuu uunnnnnnnnn nnncugguu cuccu

45

<210> 12

<211> 45

<212> RNA

<213> Influenza B virus

<220>

<221> misc\_feature

<222> (17)..(22)

<223> Dieser U-Stretch kann 5 bis 6 U's umfassen.

<220>

<221> misc\_feature

<222> (23)..(30)

<223> Diese Nukleotide (8 N's) dienen als Platzhalter für 880 bis 2300 Nukleotide ( = Segmentlänge der Virussegmente).

<400> 12

aguagwaaca rnnnnnnuuuu uunnnnnnnnn nnnnyguuu cuacu

45

<210> 13

<211> 44

<212> RNA

<213> Influenza C virus

<220>

<221> misc\_feature

<222> (15)..(20)

<223> Dieser U-Stretch kann 5 bis 6 U's umfassen.

<220>

<221> misc\_feature

<222> (21)..(30)

<223> Diese Nukleotide (10 N's) dienen als Platzhalter für 880 bis 2300 Nukleotide ( = Segmentlänge der Virussegmente)..

<400> 13

aguagaaaca agrguuuuuu nnnnnnnnnn cccuguuuc uacu

44





<110> GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit  
Artemis Pharmaceuticals GmbH

<120> Verfahren zur Identifizierung von MHC-restringierten  
Antigenen

<130> P12541

<140>  
<141>

<150> DE-199 45 171.0  
<151> 1999-09-21

<150> DE-199 51 543.3  
<151> 1999-10-26

<150> DE-199 62 508.5  
<151> 1999-12-23

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 12  
<212> RNA  
<213> Influenza A virus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(12)  
<223> 3'-konservierte Region des Wildtyp-Influenzavirus

<400> 1  
ccugcuuuug cu 12

<210> 2  
<211> 12  
<212> RNA  
<213> Influenza B virus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(12)  
<223> 3'-konservierte Region des Wildtyp-Influenzavirus

<400> 2  
nnygcucug cu 12

<210> 3  
<211> 12  
<212> RNA  
<213> Influenza C virus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(12)  
<223> 3'-konservierte Region des Wildtyp-Influenzavirus



<400> 3  
ccugcuucug cu

12

<210> 4  
<211> 13  
<212> RNA  
<213> Influenza A virus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(13)  
<223> 5'-konservierte Region des Wildtyp-Influenzavirus

<400> 4  
aguagaaaca agg

13

<210> 5  
<211> 13  
<212> RNA  
<213> Influenza B virus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(13)  
<223> 5'-konservierte Region des Wildtyp-Influenzavirus

<400> 5  
aguagwaaca rnn

13

<210> 6  
<211> 13  
<212> RNA  
<213> Influenza C virus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(13)  
<223> 5'-konservierte Region des Wildtyp-Influenzavirus

<400> 6  
agcaguagca agr

13

<210> 7  
<211> 12  
<212> RNA  
<213> Influenza A virus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(12)  
<223> 3'-terminale Nukleotidsequenz

<400> 7  
ccugguucuc cu

12

<210> 8  
<211> 12



<212> RNA  
<213> Influenza A virus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(12)  
<223> 3'-terminale Nukleotidsequenz

<400> 8  
ccuguuucua cu

12

<210> 9  
<211> 45  
<212> RNA  
<213> Influenza A virus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (17)..(22)  
<223> Dieser U-Stretch kann 5 bis 6 U's umfassen.

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (23)..(30)  
<223> Diese Nukleotide (8 N's) dienen als Platzhalter  
für 880 bis 2300 Nukleotide ( = Segmentlänge der  
Virussegmente).

<220>  
<223> Promoter-Up-Variante 1104.

<400> 9  
aguagaaaca aggnnnuuuu uunnnnnnnnn nnnccuguuu cuacu

45

<210> 10  
<211> 45  
<212> RNA  
<213> Influenza A virus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (17)..(22)  
<223> Dieser U-Stretch kann 5 bis 6 U's umfassen.

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (23)..(30)  
<223> Diese Nukleotide dienen als Platzhalter für 880  
bis 2300 Nukleotide ( = Segmentlänge der  
Virussegmente).

<220>  
<223> Promoter-Up-Variante 1920.

<400> 10  
agaagaauca aggnnnuuuu uunnnnnnnnn nnnccuguuu cuacu

45

<210> 11  
<211> 45  
<212> RNA



<213> Influenza A virus

<220>

<221> misc\_feature

<222> (17)..(22)

<223> Dieser U-Stretch kann 5 bis 6 U's umfassen.

<220>

<221> misc\_feature

<222> (23)..(30)

<223> Diese Nukleotide (8 N's) dienen als Platzhalter für 880 bis 2300 Nukleotide ( = Segmentlänge der Virussegmente).

<220>

<223> Promoter-Up-Variante 1948.

<400> 11

aguagaaaca aggnnnuuuu uunnnnnnnnn nnnccugguu cuccu

45

<210> 12

<211> 45

<212> RNA

<213> Influenza B virus

<220>

<221> misc\_feature

<222> (17)..(22)

<223> Dieser U-Stretch kann 5 bis 6 U's umfassen.

<220>

<221> misc\_feature

<222> (23)..(30)

<223> Diese Nukleotide (8 N's) dienen als Platzhalter für 880 bis 2300 Nukleotide ( = Segmentlänge der Virussegmente).

<400> 12

aguagwaaca rnnnnnnuuuu uunnnnnnnnn nnnnnnyguuu cuacu

45

<210> 13

<211> 44

<212> RNA

<213> Influenza C virus

<220>

<221> misc\_feature

<222> (15)..(20)

<223> Dieser U-Stretch kann 5 bis 6 U's umfassen.

<220>

<221> misc\_feature

<222> (21)..(30)

<223> Diese Nukleotide (10 N's) dienen als Platzhalter für 880 bis 2300 Nukleotide ( = Segmentlänge der Virussegmente).

<400> 13

aguaguaaca agrguuuuuu nnnnnnnnnn cccuguuuc uacu

44

